

ISOLASI, IDENTIFIKASI SECARA MOLEKULER MENGGUNAKAN GEN 16S rRNA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI BAKTERI SIMBION ENDOFIT ALGA *Padina* sp.

Maretsha C.H Sihombing¹⁾, Hery E. I. Simbala¹⁾, Adithya Yudistira¹⁾

¹⁾Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

ABSTRACT

Algae Padina sp. is a type of algae from the class of Phaeophyta (brown algae) which are scattered in large area of sea in North Sulawesi, and has potential as antibacterial agent. Endophytic symbionts microbial are microbes that reside in the plant body for most of their life cycle without adversely affecting the host plant., including bacteria and fungi (Kandel et al., 2017). Endophytic bacteria has great potential in the search for new drug sources (Tan and Zou, 2001). Bacterial identification can be done with a molecular-based method using 16S rRNA gene (Kattar et al., 2000). The purpose of this research is to know the antibacterial activity of endophytic symbiont bacteria isolated from algae Padina sp. against Staphylococcus aureus and Escherichia coli and to know the endophytic symbiont bacterial species of algae Padina sp. Which has the greatest antibacterial activity. Samples were smashed and dissolved up to 10⁻⁷, has been planted, isolation and inoculation on Nutrient Agar (NA) medium then incubated for 1 x 24 hours. Three different isolates of endophytic bacteria were obtained and the antibacterial activity was tested by the well-diffusion method, the diameter was measured and the results are MB.1 (6,58 mm), MB.2 (7,66 mm), MB.3 (00.00) against Staphylococcus aureus bacteria, whereas against Escherichia coli bacteria are MB.1 (7,22 mm), MB.2 (8,58 mm), MB.3 (9,61 mm). The isolate which has the greatest antibacterial power against both bacteria is the isolate MB.2. The molecular identification results indicate that the MB.2 isolate has 100% similarity with Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis.

Keywords: *Algae Padina sp., Endophytic symbiont bacteria, antibacterial activity, molecular identification, 16S rRNA gene*

ABSTRAK

Alga *Padina* sp. merupakan jenis alga yang berasal dari kelas Phaeophyta (alga coklat) yang tersebar dalam jumlah yang banyak di perairan Sulawesi Utara, memiliki potensi sebagai antibakteri. Mikroba simbion endofit adalah mikroba yang berada di dalam tubuh tanaman untuk sebagian besar siklus hidup mereka tanpa ada dampak yang merugikan bagi tanaman inang, meliputi bakteri dan jamur (Kandel *et al.*, 2017). Bakteri endofit memiliki potensi besar dalam pencarian sumber-sumber obat baru (Tan and Zou, 2001). Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan sebuah metode berbasis molekuler dengan gen 16S Rrna (Kattar *et al.*, 2000). Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari bakteri simbion endofit isolat dari alga *Padina* sp. terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dan mengetahui spesies bakteri simbion endofit dari alga *Padina* sp. yang memiliki aktivitas antibakteri terbesar. Sampel alga yang halus diencerkan sampai 10⁻⁷, dilakukan penanaman, isolasi dan inokulasi pada media *Nutrient Agar* (NA), inkubasi selama 1 x 24 jam. Diperoleh 3 isolat bakteri endofit yang berbeda dan dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi sumuran, dan diameter diukur sehingga diperoleh hasil isolat bakteri simbion endofit MB.1 (6,58 mm), MB.2 (7,66 mm), MB.3 (00.00) pada bakteri *Staphylococcus aureus*, sedangkan pada bakteri *Escherichia coli* hasil isolat bakteri endofit MB.1 (7.22 mm), MB.2 (8,58 mm), MB.3 (3,80 mm). Daya antibakteri terbesar terhadap kedua bakteri uji yaitu isolat bakteri simbion endofit MB.2. Hasil identifikasi molekuler menunjukkan bahwa isolat bakteri MB.2 memiliki kesamaan 100% dengan *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis*.

Kata kunci: Alga *Padina* sp., Bakteri simbion endofit, aktivitas antibakteri, identifikasi molekuler, Gen 16S rRNA.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara kepulauan terbesar di dunia yang memiliki wilayah laut yang sangat luas dengan sumberdaya hayati yang kaya dan beranekaragam. Untuk itu potensi biota laut dapat dimanfaatkan. Kebanyakan senyawa aktif yang terkandung dalam alga menunjukkan aktivitas antibakteri (Varier *et al.*, 2013).

Padina sp., merupakan alga yang berasal dari kelas *Phaeophyta* (alga coklat) yang tersebar dalam jumlah yang banyak di perairan Sulawesi Utara. Alga *Padina* tersebar di perairan Indonesia sekitar 134 jenis (Winarno, 1996). Berdasarkan beberapa penelitian alga *Padina* sp., dapat digunakan sebagai sumber bahan pembuatan obat, namun mengalami kendala karena penelitian mengenai eksplorasi dan pengolahannya belum berkembang sehingga pemanfaatannya sampai saat ini masih terbatas.

Mikroba simbiosis endofit adalah mikroba yang berada di dalam tubuh tanaman untuk sebagian besar siklus hidup mereka tanpa ada dampak yang merugikan bagi tanaman inang, meliputi bakteri dan jamur. Karakteristik umum mikroba endofit meliputi kemampuan untuk mensintesis hormon tanaman seperti asam indole-3-asetat, fosfat pelarut, mensekresikan siderophores, dan memberi toleransi tanaman terhadap tekanan biotik dan abiotik. Selain itu, beberapa bakteri endofit membawa gen yang diperlukan untuk fiksasi nitrogen biologis (BNF), berpotensi memungkinkan mereka untuk mengubah gas dinitrogen (N₂) menjadi bentuk nitrogen yang dapat digunakan seperti amonium dan nitrat dalam tanaman inang. (Kandel *et al.*, 2017). Bakteri endofit memiliki potensi besar dalam pencarian sumber-sumber obat baru. Hal ini

disebabkan karena bakteri cukup mudah untuk dikembangbiakkan, memiliki siklus hidup yang pendek serta mampu menghasilkan senyawa bioaktif dalam jumlah yang besar dalam waktu yang singkat (Tan and Zou, 2001). Keuntungan lain yang diperoleh dari pengembangan bakteri endofit penghasil antibakteri dapat menjaga kelestarian tumbuhan, terutama jenis tumbuhan yang langka agar tidak dieksploitasi secara terus menerus yang akhirnya akan mengakibatkan kepunahan (Prihatiningtias, 2006).

Dengan berkembangnya identifikasi mikroorganisme, maka saat ini identifikasi bakteri endofit dapat dilakukan dengan sebuah metode berbasis molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Identifikasi dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA dinilai memberikan hasil yang akurat, dan menunjukkan hasil yang dapat digolongkan pada genus atau spesies tertentu (Kattar *et al.*, 2000).

METODOLOGI PENELITIAN

Bentuk penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap yang dilakukan secara eksperimental di laboratorium yang akan menguji aktivitas antibakteri dan identifikasi secara molekuler bakteri simbiosis endofit dari alga *Padina* sp. Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2017 sampai dengan Maret 2018 di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu masker, sarung tangan, snorkel, fins, Erlenmeyer 100, 250, 500 mL (Iwaki ST Pyrex) gelas ukur 500 mL (Iwaki ST Pyrex), tabung reaksi, rak

tabung reaksi, pipet tetes, timbangan analitik (ADAM), batang pengaduk, lumpang dan alu, magnetic stirrer, cawan petri, jarum ose, pinset, *rotary shaker incubator* (Infors HT), bunsen, lemari pendingin, pencadangan baja, inkubator (Incucell), *laminar air flow* (Biotek), autoklaf (ALP), mikropipet (Ecopipette), L-Glass, mistar berskala, kertas label, plastik wrap, aluminium foil, kapas, kasa, seperangkat alat PCR (Biometra T-Personal) dan elektroforesis (Biometra T-Personal), aluminium foil, kamera.

Sampel alga *Padina* sp., bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, aquades, etanol 70%, antibiotik ciprofloxacin. Kit isolasi DNA bakteri (Geneaid), primer set (untuk bakteri), 1xMaster Mix untuk amplifikasi DNA (Bioline), ddH₂O, gel agarosa, TBE buffer, *loading dye* dan etidium bromida (EtBr).

Pengambilan Sampel

Sampel alga *Padina* sp., diambil dari perairan pantai Malalayang menggunakan alat bantu (masker, snorkel dan fins). Sampel difoto dan di ambil, lalu dimasukkan ke dalam kantong *zipper bag*, kemudian langsung dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi.

Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian aktivitas antibakteri ini disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat gelas disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, pinset, jarum ose dan *L-Glass*

dibakar dengan pembakaran diatas api langsung.

Pembuatan Media

a. Media Padat *Nutrient Agar*

Ditimbang *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 12,6 g, dilarutkan dalam 450 mL aquades (28 g/1.000 mL) menggunakan erlemeyer. Kemudian dihomogenkan dengan magnetic stirrer di atas *hot plate* sampai mendidih, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, dan dibiarkan sampai media cukup dingin. Selanjutnya media *Nutrient Agar* dituang ke dalam cawan petri sebanyak 20 mL, dan ke dalam tabung reaksi (sebagai Agar miring) sebanyak 10 mL, didiamkan sampai memadat. Media ini digunakan untuk kultur awal, kultur stok, isolasi dan inokulasi bakteri endofit.

b. Media Cair *Nutrient Broth*

Ditimbang *Nutrient broth* (NB) sebanyak 0,24 g, lalu dilarutkan dalam 30 mL aquades (8 g/1.000 mL) menggunakan erlenmeyer. Kemudian dihomogenkan dengan magnetic stirrer di atas *hot plate* sampai mendidih. Media yang telah homogen kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media dituang sebanyak 10 mL ke dalam 3 erlenmeyer. Media ini digunakan sebagai inokulasi bakteri simbiosis endofit dari alga *Padina* sp., dan untuk pengujian aktivitas antibakteri.

c. Media Padat Pengujian Antibakteri

Media dasar dibuat dengan cara ditimbang *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 3,36 g, lalu dilarutkan dalam 120 mL aquades (28 g/1.000 mL) menggunakan erlenmeyer.

Sedangkan media pembenihan dibuat dengan cara ditimbang 3,36 g *Nutrient Agar* (NA), lalu dilarutkan dalam 120 mL aquades (28 g/1.000 mL) menggunakan erlenmeyer. Setelah itu, masing-masing media dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* diatas *hot plate* sampai mendidih. Media yang telah homogen ini disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Untuk lapisan dasar dituang sebanyak 20 mL NA dari Media dasar ke dalam cawan petri, lalu didiamkan sampai memadat. Pada permukaan lapisan dasar diletakkan 6 pencadangan baja. Kemudian, suspensi bakteri dicampurkan ke dalam media pembenihan, dituangkan 20 mL campuran suspensi dan media pembenihan tersebut ke dalam tiap cawan petri lapisan dasar. Selanjutnya pencadangan diangkat dari cawan petri (Mpila, 2012).

Sterilisasi Permukaan

Sterilisasi permukaan mengacu pada metode Achlich dan Sieber (1996) yang dimodifikasi. Sterilisasi permukaan alga *Padina* sp., dengan cara merendamnya dengan alkohol 70% selama 1 menit, dilanjutkan dengan merendam di dalam larutan sodium hipoklorida (NaOCI) 5,2 % selama 4 menit, kemudian direndam kembali dengan alkohol selama 30 detik, terakhir dibilas dengan aquades.

Kultur Bakteri Endofit

Penanaman bakteri endofit yang bersimbiosis dengan alga dilakukan dengan metode sebaran (Madigan *et al.*, 2005). Sebanyak 1 g sampel alga *Padina* sp., yang telah disterilisasi permukaannya dihaluskan, kemudian dimasukkan ke dalam 9 mL aquades sehingga diperoleh pengenceran sampel sebesar 10^{-1} sampai 10^{-7} . Diambil 100 μ L dari masing-masing

seri, disebar ke dalam cawan petri yang berisi media NA dan dikubasi pada suhu 27°C -29°C selama 1x24 jam. Berdasarkan pengamatan perbedaan karakteristik morfologinya, koloni-koloni bakteri (3 koloni) dipisahkan menggunakan jarum ose pada cawan petri yang berisi media, dan diinkubasi selama 1x24 jam. Isolat bakteri endofit yang murni dipindahkan pada media miring untuk disimpan sebagai stok.

Pengujian Aktivitas Antibakteri

- a. Pembuatan Larutan Mac Farland 0,5
Larutan H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 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 (Whitman *et al.*, 2010).
- b. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji
Bakteri uji yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang telah diinokulasi diambil \pm 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 dituangkan ke media pembenihan.
- c. Pembuatan Larutan Kontrol Positif dan Kontrol Negatif
Larutan Kontrol positif ciprofloxacin 5 μ g/50 μ L. Larutan ini digunakan sebagai kontrol positif pada pengujian. Larutan kontrol negatif digunakan aquades steril.
- d. Penyiapan Bakteri Symbion Endofit
3 isolat bakteri endofit diambil dengan jarum ose kemudian masing-masing diinokulasikan ke dalam 5 mL media

cair *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi selama 24 jam dalam *rotary shaker incubator* pada suhu 27°C – 29°C (Infors HT).

e. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Isolat bakteri endofit (3 isolat) yang telah diinokulasi dalam media cair, kontrol positif dan kontrol negatif, dipipet sebanyak 50µL dan diteteskan di lubang sumuran yang berbeda pada masing-masing cawan petri yang berisi media pengujian. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

f. Pengamatan dan Pengukuran Zona Hambat

Pengamatan dilakukan setelah 1 x 24 jam masa inkubasi. Zona bening yang terbentuk di sekitar lubang sumuran diamati. Diameter zona hambat ini kemudian diukur dengan menggunakan mistar berskala dengan cara diameter keseluruhan dikurangi diameter sumuran 7 mm (Vandepitte *et al.*, 2005). Diameter zona hambat yang terukur dikategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan penggolongan Davis and Stout, 1971.

Identifikasi Bakteri Endofit Secara Molekuler

a. Isolasi DNA

Sampel bakteri endofit di media miring diambil menggunakan mikro pipet dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang telah berisi buffer GP1 sebanyak 400 µL, kemudian dikocok. Selanjutnya sampel dalam tabung eppendorf dimasukkan ke dalam *thermoblock* pada suhu 60°C selama 15 menit. Tabung kemudian disentrifugasi (ultrasentrifugasi). Sampel kemudian dimasukkan buffer GP2 sebanyak 100 µL, dan didinginkan dalam freezer selama 1 menit, disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 10.000

rpm. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung *spin column.*, dan ditambahkan buffer GP3 sebanyak 750 µL. Sebagian dari supernatan dipindahkan pada *collection tube* beserta *spin column* lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Ditambahkan sisa supernatan yang ada dengan buffer GP3. Selanjutnya disentrifugasi 10.000 rpm selama 1 menit, filtrat dibuang. Ditambahkan buffer W1 sebanyak 400 µL ke dalam tabung *spin column* disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Setelah itu filtrat dibuang lalu dilakukan pencucian kedua dengan mencampurkan *wash buffer* sebanyak 600 µL sentrifugasi kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit. Sementara itu *elution buffer* dipanaskan pada *thermoblock* pada suhu 60°C. Setelah sentrifugasi selesai, membran dengan DNA dipindahkan ke dalam tabung eppendorf baru dan dikering-anginkan selama 2 menit. Membran ditambahkan *elution buffer* sebanyak 100 µL ke dalam tabung *collection tube* dan *spin column.* Selanjutnya sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit.

b. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) dilakukan menggunakan mesin PCR combi block (whatman biometra Germany). Prosesnya meliputi 3 tahap yaitu denaturasi, annealing dan ekstensi (elongasi). Proses ini dikerjakan pada sampel DNA genomik bakteri yang telah diisolasi. Primer yang digunakan untuk proses PCR yaitu rancangan primer *forward* BKXF (5'- GCY TAA YAC ATG CAA GTCG-3') dan primer *reverse* BKYR (5'-TTG ACG TCA TCC CCA CCT TCC-3') (Kolondam, *in press*) . Amplifikasi dengan teknik PCR dilakukan dengan variasi komposisi reagen dan

kondisi reaksi PCR yang telah dimodifikasi.

c. Elektroforesis dan Visualisasi

Bubuk agarose ditimbang, dilarutkan dalam TBE buffer, kemudian dicampur dan dididihkan sampai larut hingga berwarna jernih. Diamkan larutan agarose mendingin (~60°C) lalu tuangkan dalam cetakan *Casting tray* beserta sisirnya (Mayangsari, 2012).

Peralatan Elektroforesis yaitu tangki gel, penutup tangki, casting tray, sisir, power supply. Campur sample DNA dengan bufer (*loading bufer*) untuk memudahkan sampel masuk kedalam sumuran. Sampel sebanyak 5 µl dimasukkan ke dalam sumur gel dalam *chamber* elektroforesis. Power supply dinyalakan selama 60 menit, 100 volt. Visualisasi dilakukan dengan sinar UV pada UV-transiluminator. Hasil deteksi didokumentasikan (Mayangsari, 2012).

d. Sekuensing gen 16S rRNA

Proses sekuensing dilakukan dengan mengirim data ke 1st BASE Malaysia. Hasil sekuensing DNA dianalisis menggunakan metode BLAST secara online pada website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk dicocokkan dengan data spesies pada Gen Bank untuk mencari kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA dalam menentukan spesies isolat bakteri endofit dari alga *Padina* sp., yang memiliki daya antibakteri terbesar

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Endofit

Isolasi bakteri endofit dari alga *Padina* sp., dilakukan pada setiap hasil pengenceran bertingkat sampai 10⁻⁷. Setiap pengenceran pada proses sterilisasi permukaan sampel dilakukan penanaman awal pada cawan petri yang berisi media NA untuk menumbuhkan bakteri endofit. Air bilasan terakhir pada proses sterilisasi permukaan juga dimasukkan ke dalam cawan petri berisi media NA. Kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam, cawan petri yang berisi bilasan terakhir tidak tumbuh bakteri, dan pada cawan petri yang berisi hasil pengenceran sampel tumbuh koloni-koloni bakteri di setiap cawan petri. Hasil isolasi memperlihatkan banyaknya koloni yang bertumbuh dan dipilih 3 koloni bakteri yang berbeda sesuai dengan pengamatan morfologi yaitu dari hasil pengenceran 10⁻³, 10⁻⁴, dan 10⁻⁵. Isolat bakteri endofit yang berbeda dimurnikan dengan teknik isolasi bakteri metode cawan gores kuadran dan diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 27°C – 29°C. Isolasi dilakukan berulang sebanyak 4 kali untuk 3 isolat bakteri endofit. Setelah itu, 3 koloni bakteri endofit yang telah murni diinokulasikan ke dalam medium NA miring sebagai stok bakteri endofit.

Pengamatan Morfologi

Tabel 1. Pengamatan Morfologi Koloni Isolat Bakteri Endofit dari Alga *Padina* sp.

NO	Kode		Bentuk	Elevasi	Tepian	Warna
	Isolat	Ukuran				
1	B2 (10 ⁻³)	Sedang	Bulat	Timbul Datar	Sedikit berombak	Putih
2	B3 (10 ⁻⁴)	Sedang	Bulat	Timbul cembung	Utuh	Putih kekuningan.
3	B4 (10 ⁻⁵)	Kecil	Tak beraturan	Timbul datar	Berombak	Putih

Dari hasil pengamatan morfologi koloni, diketahui bahwa bakteri endofit alga *Padina* sp., memiliki ukuran, bentuk, elevasi, tepian, dan warna yang berbeda disetiap isolat bakteri endofit.

Pewarnaan Gram Isolat Bakteri Endofit

Hasil pewarnaan Gram dari 3 isolat bakteri endofit, 2 isolat bakteri dengan kode isolat MB.1 dan MB.2 memiliki bentuk *bacil* dengan Gram positif dan berbeda dengan kode isolat MB.3 memiliki bentuk *coccus* dengan Gram negatif. Dikatakan negatif karena masih terdapat sisa *Safranin* yang mewarnai sel bakteri maka terjadi warna merah, sedangkan Gram positif masih mempertahankan warna dari kristal violet.

Uji Aktivitas Antibakteri dari Bakteri Symbion Endofit Isolat Alga *Padina* sp.

Pengujian aktivitas antibakteri dari 3 isolat bakteri endofit dengan kode isolat MB.1, MB.2, dan MB.3 pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan metode difusi sumuran. Metode ini menjadi metode yang dipilih dalam uji aktivitas karena memiliki keuntungan yaitu prosedurnya yang sederhana (mudah dan praktis) untuk dilakukan dan dapat memberikan hasil yang lebih dibandingkan dengan metode cakram kertas *Kirby bauer* (Prayoga, 2013).

Tabel 2. Rata-rata Diameter Zona Hambat Bakteri Symbion Endofit isolat Alga *Padina* sp. terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

No	Kode Isolat	Rata-rata Diameter Zona Bening dari bakteri Symbion Endofit (mm)	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
		Rata-rata	Rata-rata
1	MB.1	6,58	7,22
2	MB.2	7,66	8,58
3	MB.3	0,00	3,80
4	Kontrol positif	14,68	14,13
5	Kontrol negatif	00.00	00.00

Zona hambat di sekeliling sumur uji dilakukan dengan cara mengukur jarak dari tepi sumur uji ke batas lingkaran zona hambat menggunakan jangka sorong (ketelitian 0.01 mm) pada beberapa sisi sumur uji, lalu dirata-ratakan. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali pada masing-masing bakteri symbion endofit. Pengulangan dilakukan untuk memperoleh hasil yang akurat. Berdasarkan kriteria Davis and Stout (1971) kategori lemah kurang dari 5 mm, kategori sedang 5 mm - 10 mm, kategori kuat 10 mm - 20 mm, kategori sangat kuat lebih dari 20 mm. Dari pengukuran rata-rata diameter zona

hambatnya, maka daya antibakteri dari symbion endofit pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan MB.1 (6,58 mm) termasuk kategori sedang , MB.2 (6,66 mm) termasuk kategori sedang, dan MB.3 (00.00) dengan kategori lemah atau tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* karena tidak terdapat zona bening disekitar lubang sumuran. Sedangkan daya antibakteri dari symbion endofit pada bakteri *Escherichia coli* dengan MB.1 (7,22 mm) termasuk kategori sedang, MB.2 (8,58 mm) termasuk kategori sedang, MB.3 (3,80 mm) termasuk kategori lemah. Dengan demikian dapat

diketahui bahwa bakteri simbion endofit dari alga *Padina* sp., memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

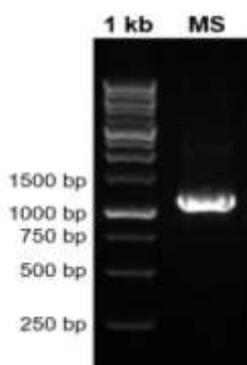
Dari hasil perhitungan rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan isolat bakteri endofit lebih besar menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif *Escherichia coli*.

Menurut Radji (2005), hal ini disebabkan adanya perbedaan struktur dinding sel kedua jenis bakteri tersebut. Dinding sel bakteri Gram positif terdiri atas beberapa lapisan peptidoglikan yang membentuk struktur yang tebal dan kaku serta mengandung substansi dinding sel yang disebut asam teikoat, sedangkan dinding sel bakteri Gram negatif terdiri atas satu atau lebih lapisan peptidoglikan yang tipis dan membran di bagian luar lapisan peptidoglikan. Karena hanya mengandung sedikit lapisan peptidoglikan dan tidak mengandung asam teikoat, maka dinding sel bakteri Gram negatif lebih rentan terhadap guncangan fisik, seperti pemberian antibiotik atau bahan antibakteri lainnya. Selain itu, perbedaan struktur dinding sel inilah yang menyebabkan kedua jenis bakteri tersebut memberikan respon terhadap pewarnaan

Gram menunjukkan bakteri simbion endofit MB.2 memiliki nilai perhitungan rata-rata diameter zona hambat yang lebih besar dibanding isolat bakteri endofit MB.1 dan MB.3 terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* maupun *Escherichia coli*. Sehingga isolat bakteri endofit MB.2 dilanjutkan untuk identifikasi molekuler dengan menggunakan gen 16S rRNA, untuk mengetahui jenis bakteri tersebut.

Identifikasi Bakteri Endofit Secara Molekuler

Identifikasi molekuler dilakukan pada isolat bakteri alga *Padina* sp MB.2. Hasil elektroforesis dari isolat MB.2 tersebut diketahui terdapat pita terespirasi dan sejajar dengan marker sekitar 1.200 pasang basa (*base pairs*) (Gambar 1). Kemudian isolat bakteri simbion endofit dideterminasi dengan menggunakan sekuen gen 16S rRNA, dianalisis di 1st base Malaysia. Kromatogram yang diperoleh dari hasil sekuensing disunting menggunakan software Geneious v5.6. Hasil sekuensing DNA dianalisis menggunakan program BLAST melalui media Online NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Kolondam *et al.*, 2012).



Gambar 1. Hasil Elektroforesis dari Produk Amplifikasi Gen 16S rRNA.

Dari hasil elektroforesis dikirim ke 1st BASE Malaysia dan diperoleh data berupa Kromatogram yang akan disunting pada aplikasi Geneious. Hasil sequencing adalah

menjadi urutan basa nukleotida (gambar 2) dianalisis pada program BLAST melalui media online NCBI

```
>MS
AGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCC
GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTGAAATTGAAAGGCGG
CTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
CCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
AGCAACGCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTGTTGTTAGGGAAGAAC
AAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GCGCGCGCAGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAAT
TGAAAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGGACTTCTGGTCTGTAAGTACACTG
AGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGGCGTAAACGA
TGAGTGCTAAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTGTAGTGTGAAAGTTAACGCAATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCG
AAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT
GACGTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTG
CCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAA
```

Gambar 2. Urutan Basa Nukleotida Isolat Bakteri Endofit MB.2 Hasil Sekuensing

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillaceae bacterium strain x_org_Bacillus_cereus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1971	1971	100%	0.0	100%	MH036323.1
Bacillaceae bacterium strain c3_org_Bacillus_cereus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1971	1971	100%	0.0	100%	MH036310.1
Bacillus thuringiensis strain 75A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1971	1971	100%	0.0	100%	MH032759.1
Bacillus cereus strain 2015 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1971	1971	100%	0.0	100%	MG255976.1
Bacillus cereus strain 2005 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1971	1971	100%	0.0	100%	MG255969.1
Bacillus thuringiensis partial 16S rRNA gene,	1971	1971	100%	0.0	100%	J1786266.1

Gambar 3. Hasil Analisis BLAST dari Isolat Bakteri Endofit MB.2

Dari hasil analisis program BLAST, diperoleh bakteri *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis* yang artinya bahwa isolat bakteri simbiosis endofit dari alga *Padina* sp. yang telah dilakukan sekuensing dianggap sebagai spesies yang sama dengan *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis*. Hal ini disebabkan karena persentasinya dari panjang nukleotida yang dibandingkan urutan nukleotidanya pada program BLAST 100% menunjukkan kesamaan dengan nukleotida bakteri *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis*.

Dari hasil penelitian Giffel et al (1997), meskipun identifikasi berbasis 16S rRNA dan primer PCR berbasis gyrB

untuk diskriminasi *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis*, ketika sejumlah besar strain *Bacillus* diuji, hasilnya menunjukkan bahwa diskriminasi antara *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis* adalah sulit untuk dibedakan.

Dari hasil penelitian Chen (2002), perbedaan urutan di wilayah variabel (V1) 16S rRNA dan gen gyrB antara *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis*, dirancang PCR primer khusus untuk *Bacillus*. Ketika primer ini digunakan untuk membedakan *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis*, 6 dari 82 strain *Bacillus cereus* diidentifikasi sebagai *Bacillus thuringiensis*, sementara 67 dari

73 *Bacillus* strain *Bacillus thuringiensis* adalah diidentifikasi sebagai *Bacillus cereus*. Analisis urutan dari situs *annealing* primer menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang jelas di wilayah V1 16S rRNA, dan di gen *gyrB* antara *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis*. Dari beberapa hasil penelitian tersebut menunjukkan masih sulit untuk membedakan spesies dari Genus *Bacillus* sp, terutama spesies bakteri *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis* yang memiliki hubungan kekerabatan yaitu dalam satu kelompok yang sama, dan dapat menghasilkan gen *Cry*. Jumlah nukleotida yang dianalisis pada program BLAST sebanyak 1.067 basa nukleotida yang jumlahnya masih kurang panjang untuk mencakup area variatif yang membedakan antar spesies dari Genus *Bacillus* sp. menjadi faktor yang dapat menyebabkan hasil identifikasi Molekuler sama.

KESIMPULAN

1. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa, terdapat bakteri endofit yang berasosiasi dengan alga *Padina* sp., dan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yaitu diameter zona hambat pada bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu MB.1 (6,58 mm) termasuk kategori sedang, MB.2 (6,66 mm) termasuk kategori sedang, dan MB.3 (00.00) dengan kategori lemah. Sedangkan daya antibakteri dari simbiosis endofit pada bakteri *Escherichia coli* dengan MB.1 (7,22 mm) termasuk kategori sedang, MB.2 (8,58 mm) termasuk kategori sedang, MB.3 (3,80 mm) termasuk kategori lemah.

2. Setelah dilakukan identifikasi secara molekuler menggunakan Gen 16S rRNA terhadap isolat bakteri simbiosis endofit MB.2 dengan memiliki kesamaan 100% dengan bakteri *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis*.

SARAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan isolasi, uji aktivitas antibakteri bakteri simbiosis endofit yang diisolasi dari alga *Padina* sp., maka dapat diberikan saran yaitu :

1. Melakukan Pelacakan filogeni dengan teknik *Molecular phylogenetics* untuk menentukan hubungan antar spesies bakteri sehingga dapat diperoleh 1 spesies bakteri yang diduga adalah jenis bakteri simbiosis endofit.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut uji aktivitas antibakteri pada jenis bakteri lain misalnya *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*

DAFTAR PUSTAKA

- Achlich, K., Sieber, T.N. 1996. The profusion of Dark Septate Endophytic Fungi in non-Ectomycorrhizal Fine Roots of Forest Trees and Shrubs. *New Phytol.* **105**: 259-270.
- Chen, M.L., and Tsen, H.Y. 2002. Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* Gene based PCR Primers and Sequencing of Their Annealing sites. *Journal of applied microbiology.* **92** (5): 9-12.
- Davis, W.W., and Stout, T.R. 1971. Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay. *Journal Microbiology.* **22** (4): 659 – 665.

- Giffel, M.C.I., Beumer, R.R., Klijn, N., Wagendorp, A., Rombouts, F.M. 1997. Discrimination between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* using specific DNA probes based on variable regions of 16S rRNA. *Journal of Applied Microbiology*. **146** (1): 47-51.
- Kandel, S.L., Joubert, P.M., Doty, S.L. 2017. Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. *Microorganisms*. **5**(4):77.
- Kattar, M.M., Chavez, J.F., Limaye, A.P., Rassoul-Barrett, S.L., Carlson, L.C. 2000. Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the Causative Agent of Fatal Septicemia. *Journal of Clinical Microbiol.* **38**: 789-794.
- Kolondam, B.J. Primer forward BKXF dan primer reverse BKYR (siap terbit).
- Kolondam, B.J., Lengkong, E., Mandang, J.P., Runtuuwu, S., Pinaria, A. Barcode DNA *Anthurium Gelombang Cinta (Anthurium plowmanii)* berdasarkan gen RBCL dan matK. *Jurnal Bioslogos*. **3** (1): 17 – 25
- Madigan M. T., Martinko J.M., Brock, T.D. 2005. *Brock Biology of Microorganisms*. 11th Edition. Pearson Prentice Hall, New Jersey.
- Mayangsari, Y. 2012. *Electrophoresis*. Department of Food and Agricultural Products Processing Technology Faculty of Agricultural Technology Gadjah Mada University, Yogyakarta.
- Mpila, D. A. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun *Mayana (Coleus atropurpureus benth)* Terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* Secara *Invitro* [skripsi]. Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Sam Ratulangi, Manado.
- Prayoga, E. 2013. *Perbandingan Efek Ekstrak Daun Sirih Hijau Piper betle L. dengan Metode Difusi Disk dan Sumuran terhadap Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus* [Laporan Penelitian]. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatulla, Jakarta
- Prihatiningtias, W., dan Wahyuningsi, M. S. H. 2006. *Prospek Mikroba Endofit sebagai Sumber Senyawa Bioaktif*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Radji, M. 2005. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Farmasi Edisi Kedua*. Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok.
- Tan, R. X., and Zou W. X. 2001. Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites. *Natural Product Repost*. **18**: 448-459.
- Vandepitte, J., Varhaegen, J., Engbaek, K., Rohner, P., Piot, P., Heock, C.G. 2010. *Prosedur untuk Laboratorium Dasar untuk Bakteriologi Klinis, Edisi 2*. Diterjemahkan oleh dr. Lyana Setiawan. Buku Kedokteran RGC, Jakarta.
- Varier, K.M., Milton, M.C., Arulvasu, C., Gajendran, B. 2013. Evaluation of Antibacterial Properties of Selected Red Seaweeds from Rameshwaram Tamil Nadu India. *Journal of Acamedia and Industrial Research*. **1** (1): 667-670.

Whitman, K.A and MacNair, N.G. 2010. Finfish and Shellfish Bacteriology Manual: Techniques and Procedures. (Online).

[http://books.google.co.id/books?id=hlk04vjlam0C&printsec=frontcover&dg=Finfish+and+Shellfish+Bacteriology+Manual:+Techniques+and+Procedures&hl=id&ei=5_zsTYvpK4_2tgP4ulngDQ&sa=X&oi=](http://books.google.co.id/books?id=hlk04vjlam0C&printsec=frontcover&dg=Finfish+and+Shellfish+Bacteriology+Manual:+Techniques+and+Procedures&hl=id&ei=5_zsTYvpK4_2tgP4ulngDQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCcQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false)

[book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCcQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false.](http://books.google.co.id/books?id=hlk04vjlam0C&printsec=frontcover&dg=Finfish+and+Shellfish+Bacteriology+Manual:+Techniques+and+Procedures&hl=id&ei=5_zsTYvpK4_2tgP4ulngDQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCcQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false)
[Diakses 18 Maret 2018. Pukul 09.01 WITA]

Winarno, F.G. 1996. Teknologi Pengolahan Rumput Laut . Pustaka Sinar Harapan, Jakarta.