

Potential of Endophytic Bacteria from Pauh Stems (*Mangifera sumatrana* Miq) as Antimicrobials

Muthia Miranda Zaunit¹, Verawati², Suci Anela Putri³, Okta Fera⁴

Prodi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Perintis Indonesia

*)E-mail: z.muthiamiranda@gmail.com

Info Artikel

Sejarah Artikel :

Diterima : 12.11.2023

Disetujui : 25.11.2023

Dipublikasikan :

30.11.2023

Kata Kunci:

Isolat, bakteri endofit,
pauh, antimikroba

Keywords:

*Isolate, endophytic
bacteria, pauh,
antimicrobial*

Abstrak

Latar belakang: Bakteri endofit merupakan mikroorganisme yang siklus hidupnya berada dalam jaringan tanaman tanpa menyebabkan kerusakan pada inang serta mampu menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif, salah satunya senyawa antibakteri dari tanaman pauh (*Mangifera sumatrana* Miq.). **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menguji aktivitas antimikroba dari bakteri endofit pada batang pauh terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans* serta melakukan identifikasi secara molekuler menggunakan Gen 16S rRNA terhadap bakteri endofit yang memiliki daya antimikroba terbesar. **Metode:** Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode *disc diffusion*. **Hasil:** Hasil karakteristik bakteri endofit yang didapatkan dengan metode penanaman ada 6 isolat yaitu 4 isolat dari batang luar (BL1, BL2, BL3, dan BL4) dan 2 isolat dari batang dalam (BD1 dan BD2). Hasil uji aktivitas antimikroba isolat BL2 dan BL3 terhadap *Staphylococcus aureus* didapati zona hambat sebesar 13,20 mm dan 12,05 mm sedangkan terhadap *Candida albicans* dan *Escherichia coli* tidak memiliki aktivitas antimikroba. Hasil identifikasi molekuler menunjukkan bahwa BL2 merupakan *Bacillus altitudinis*. **Simpulan dan saran:** Isolat bakteri dari batang pauh berpotensi sebagai antibakteri.

Abstract

Background: Endophytic bacteria are microorganisms whose life cycle resides in plant tissue without causing damage to the host and are capable of producing bioactive compounds, one of which is antibacterial compounds from the papuh plant (*Mangifera sumatrana* Miq.). **Objective:** This study aims to isolate and test the antimicrobial activity of endophytic bacteria in the stems against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* and to carry out molecular identification using the 16S rRNA gene against endophytic bacteria that have the greatest antimicrobial power. **Method:** Antimicrobial activity testing was carried out using the disc diffusion method. **Results:** The results of the characteristics of endophytic bacteria obtained using the planting method were 6 isolates, namely 4 isolates from the outer stem (BL1, BL2, BL3, and BL4) and 2 isolates from the inner stem (BD1 and BD2). The results of the antimicrobial activity test for isolates BL2 and BL3 against *Staphylococcus aureus* found an inhibition zone of 13.20 mm and 12.05 mm, whereas against *Candida albicans* and *Escherichia coli*, they had no antimicrobial activity. The results of molecular identification show that the BL2 is *Bacillus altitudinis*. **Conclusions and suggestions:** Bacterial isolates from pauh stems have the potential to be antibacterial.

PENDAHULUAN

Peningkatan kasus infeksi mengakibatkan peningkatan penggunaan antibiotik. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat memicu terjadi resistensi terhadap bakteri. Eksplorasi untuk mencari sumber antibiotik yang baru perlu dilakukan, salah satunya dengan memanfaatkan antibakteri dari bahan alam. Tumbuhan merupakan salah satu sumber daya alam yang sangat penting dalam upaya pengobatan. Salah satu sumber alami yang dimanfaatkan adalah pauh (*Mangifera sumatrana* Miq).

Pauh merupakan tumbuhan yang tidak dibudidayakan yang belum banyak diketahui manfaatnya. Tumbuhan ini memiliki umur panjang yang dapat hidup liar tanpa adanya penanaman khas dan memiliki bentuk batang yang besar dengan tinggi mencapai 5-10 m dengan diameter 50-100 cm (Fitmawati et al., 2013).

Isolat yang diperoleh dari tumbuhan non obat juga memiliki potensi sebagai antimikroba (Castillo et al., 2003). Isolat yang diperoleh dari batang memiliki aktivitas yang baik dalam menghasilkan senyawa antimikroba (Anggiastanti & Hilda Putri, 2020). Bakteri endofit yang diisolasi dari bagian batang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan mikroba patogen (Safira et al., 2017).

Untuk mengetahui spesies bakteri yang diisolasi perlu dilakukan identifikasi secara molekular. Identifikasi berbasis molekular dengan menggunakan gen 16S rRNA merupakan metode yang tepat digunakan untuk identifikasi bakteri endofit.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

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, *microtube*, pipet mikro, jangka sorong, kertas label, plastik wrap, aluminium foil, tisu, kapas, kasa, mikroskop, kaca objek, kertas koran, kompor, tabung ependorf, tabung spin coloumn, termoblock, alat PCR dan alat elektroforesis.

Batang pauh, isolat *Escherichia coli*, isolat *Staphylococcus aureus*, isolat *Candida albicans*, *aquadest* steril, etanol 96%, NaCl 0.9%, 1%, H₂SO₄ 1%, BaCl₂·2H₂O 1,175%, iodin, fuksin, media *Nutrient Agar* (NA), media *Muller Hinton Agar* (MHA), media *Sabouraud Dextrise Agar* (SDA), Na-hipoklorit 5.25%, *disc amoxicillin*, *disc gentamicin*, *disc ketoconazole* 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 TE *buffer*.

Cara kerja

1. Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah batang pauh dengan 2 kategori yang berbeda yaitu batang bagian luar dan batang bagian dalam. Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Maret 2022 di Guo Kuranji, Padang, Sumatra Barat.

2. Identifikasi Sampel

Identifikasi tumbuhan pauh dilakukan di Herbarium ANDA Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Andalas, Padang.

3. Sterilisasi alat dan pembuatan media agar

- a. Sterilisasi Alat
- b. Pembuatan *Nutrient Agar* (NA)
- c. Pembuatan media *Sabouraud Dextrise Agar* (SDA)
- d. Pembuatan *Mueller Hinton Agar* (MHA)

3. Isolasi dan Purifikasi Bakteri Endofit Batang pauh

Sampel batang cuci dengan air mengalir setelah itu dilakukan sterilisasi dengan merendam secara berturut-turut di dalam alkohol 96% selama 1 menit, Na-Hipoklorit 5,25% selama 5 menit, dan alkohol 96% selama 30 detik. Lalu bilas dengan air steril selama 1 menit, bilasan dengan air steril diulang sebanyak tiga kali. Batang yang telah steril di potong sepanjang 1 cm secara melintang dan membujur dengan pisau steril 32 secara aseptis lalu diletakan di atas NA kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

4. Pemurnian Isolat Bakteri

Pemurnian koloni bakteri dilakukan dengan memindahkan 1 ose koloni ke dalam cawan petri yang berisi media NA baru dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diperoleh biakan murni, bakteri endofit dipindahkan ke agar miring NA.

5. Identifikasi Morfologi Koloni Bakteri Endofit

Morfologi secara makroskopik Bentuk koloni (dilihat dari atas): berupa titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa akar, serupa kumparan. Permukaan koloni (dilihat dari samping): rata, timbuldatar, melengkung, membukit, serupa kawah. Tepi koloni (dilihat dari atas): utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang dan keriting. Warna koloni : keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan, atau hampir bening.

6. Uji Aktivitas Antimikroba

Isolat bakteri endofit dari masing-masing sampel diambil dengan jarum ose kemudian masing-masing diinokulasikan kedalam 5 ml NaCl 0,9% kemudian dikocok hingga homogen.

Mikroba uji disuspensikan di dalam NaCl fisiologis sebanyak 9 ml. Selanjutnya, suspensi mikroba uji disetarakan dengan Larutan Mc Farland 0,5. Suspensi mikroba uji diambil 200 µl dan diratakan pada permukaan MHA untuk *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dan SDA untuk

Candida albicans. Permukaan media diberi kertas cakram yang ditetesi dengan suspensi isolat DT, DM dan kontrol positif (*amoxicillin*, *gentamicin*, dan *ketoconazole*).

Zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram diamati. Diameter zona bening ini kemudian diukur dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona bening diukur berdasarkan penggolongan CLSI.

7. Identifikasi Bakteri Endofit Terpilih Secara Molekuler

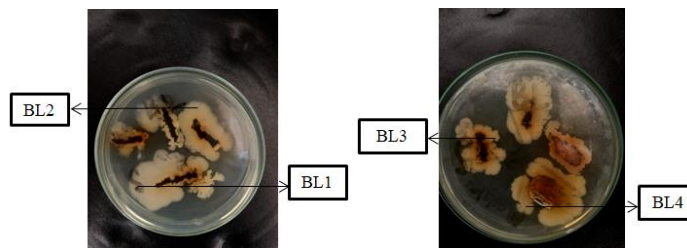
Isolat bakteri endofit yang memiliki aktivitas antimikroba terbesar diambil menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam *microtube* yang telah berisi Pospate Buffer Saline (PBS) sebanyak 1 ml. Selanjutnya sampel dalam *microtube* dimasukkan ke dalam sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Setelah disentrifugasi natant dibuang lalu ditambahkan sebanyak 1 ml TE buffer kemudian dikocok. Selanjutnya diinkubasi dengan heating block selama 10 menit dengan suhu 95°C kemudian suspensi bakteri tersebut disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Selanjutnya supernatan dipindahkan ke dalam tabung *microtube* 1,5 ml, kemudian disimpan ke dalam freezer. DNA sampel yang telah diisolasi dilanjutkan diperbanyak dengan metode PCR yang terdiri dari 3 tahap denaturasi, annealing dan extension menggunakan primer 16S rRNA.

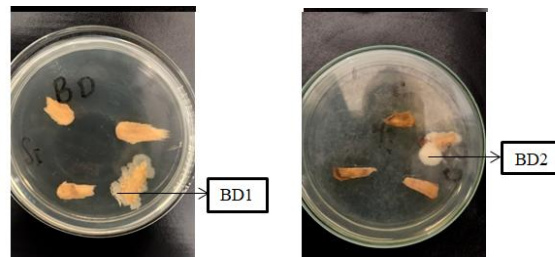
DNA sampel yang telah diperbanyak dielektroforesis. Setelah itu alat elektroforesis dimatikan kemudian gel dari alat tersebut diambil lalu di pindahkan kedalam UV-transiluminator untuk dilakukan visualisasi lalu diamati hasilnya dan didokumentasikan.

Hasil data eletroforesis disekuensing dengan cara mengirim data ke 1st BASE Malaysia melalui PT. Genetika Science. 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 37 nukleotida gen 16S rRNA dalam menentukan spesies isolat bakteri endofit terpilih.

HASIL PENELITIAN

Terdapat 6 isolat bakteri yang diisolasi dari batang pauh, yaitu 4 isolat dari batang luar (BL1, BL2, BL3, dan BL4) dan 2 isolat dari batang dalam (BL1 dan BL2) (Gambar 1).





Gambar 1. Hasil isolasi bakteri endofit dari batang pauh

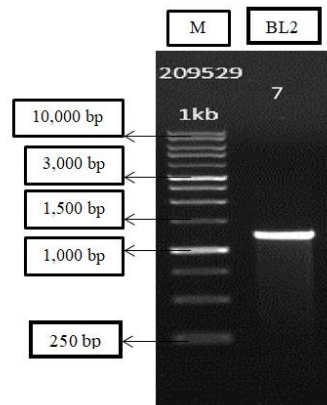
Tabel 1. Hasil identifikasi morfologi koloni bakteri endofit batang pauh

No	Kode isolat	Bentuk	Permukaan	Tepi	Warna
1.	BL1	Tidak Beraturan	Timbul Datar	Terdapat Lengkungan	Putih Susu
2.	BL2	Tidak Beraturan	Timbul Datar	Bergelombang	Putih Susu
3.	BL3	Tidak Beraturan	Timbul Datar	Bergerigi	Putih Kekuningan
4.	BL4	Tidak Beraturan	Timbul Datar	Bergerigi	Putih Kekuningan
5.	BD1	Bulat	Timbul Datar	Terdapat Lengkungan	Putih Susu
6.	BD2	Tidak Beraturan	Timbul Datar	Berserabut	Putih Susu

Keterangan : BL : Batang Luar BD : Batang Dalam

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antimikroba

Kode Isolat dan Kontrol +	Diameter Zona Bening (mm)		
	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C.albicans</i>
BL1	-	-	-
BL2	13,20	-	-
BL3	12,05	-	-
BL4	-	-	-
BD1	-	-	-
BD2	-	-	-
<i>Amoxicilin</i>	38,10		
<i>Gentamicin</i>		22,70	
<i>Ketokonazole</i>			21,65



Gambar 2. Hasil elektroforesis dari produk amplifikasi gen 16S rRNA isolat bakteri endofit batang luar 2 (BL2) dengan ukuran pita DNA ± 1300 bp
M = DNA marker, BL= isolat batang luar 2

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
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 altitudinis strain NPB34b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus altitudinis	2034	2034	100%	0.0	100.00%	1480	MT598007.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus xiamenensis strain SW11SE 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus xiamenensis	2034	2034	100%	0.0	100.00%	1484	MN069010.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus altitudinis strain cqsq_g9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus altitudinis	2034	2034	100%	0.0	100.00%	1486	MN826596.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus altitudinis strain SCU11 chromosome, complete genome	Bacillus altitudinis	2034	16274	100%	0.0	100.00%	3755707	CP038517.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus altitudinis strain 11-1-1 chromosome, complete genome	Bacillus altitudinis	2034	16252	100%	0.0	100.00%	3879167	CP054136.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus sp. (in: Bacteria) strain AJM156 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: Bacteria)	2034	2034	100%	0.0	100.00%	1439	MT444118.1

Gambar 3. Hasil Analisis BLAST Isolat Bakteri Endofit BL2

PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan adalah batang pauh yang di ambil di daerah Guo Kuranji kecamatan Koto Tangah Kota Padang, Sumatra Barat. Kemudian diidentifikasi di Herbarium ANDA dengan No Identifikasi: 528/K-ID/ANDA/XI/2021 dengan tujuan untuk mengenali tumbuhan yang dimaksud adalah tumbuhan yang sama. Sampel batang pauh ini memiliki nama spesies *Mangifera sumatrana* Miq. Sampel diambil dengan dua kategori yaitu batang luar dan batang dalam.

Dari hasil pemurnian diperoleh 6 isolat koloni bakteri murni pada batang pauh. Masing-masing isolat diberi kode BL1 (Batang Luar 1), BL2 (Batang Luar 2), BL3 (Batang Luar 3), BL4 (Batang Luar 4), BD1 (Batang Dalam 1) dan BD2 (Batang Dalam 2) (Gambar 1). Adapun jumlah populasi bakteri endofit pada masing-masing sampel berbeda-beda. Hal tersebut disebabkan karena populasi bakteri endofit dipengaruhi oleh lokasi pengambilan sampel (Yandila et al., 2018).

Berdasarkan uji aktivitas antimikroba isolat bakteri endofit dari batang pauh terhadap 3 mikroba uji diperoleh hasil yang berbeda. Hasil pengujian aktivitas antimikroba isolat bakteri endofit terhadap *Staphylococcus aureus* adalah zona hambat sebesar 13,20 mm untuk BL2 dan 12,05 mm untuk

BL3, sebesar 38,10 mm untuk *amoxicillin* dan tidak ada zona bening yang dihasilkan isolat lainnya. Pada pengujian aktivitas antimikroba isolat terhadap *Escherichia coli* dan *Candida albicans* tidak terdapat zona bening untuk semua isolat, 22,70 mm terhadap *Gentamicin* dan 21,65 mm untuk *ketokonazole*.

Isolat hanya memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, Struktur dinding sel bakteri *Staphylococcus aureus* relatif lebih sederhana sehingga memudahkan senyawa antibakteri masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja (Sutton *et al.*, 2021). Isolat tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*. Bakteri ini merupakan bakteri Gram negatif yang mempunyai sifat kurang rentang terhadap beberapa antibiotik. Struktur dinding sel bakteri Gram negatif relatif lebih kompleks dan berlapis dibandingkan dengan dinding sel bakteri Gram positif, sehingga dinding bakteri Gram negatif lebih sulit ditembus oleh zat antibakteri (Pandur *et al.*, 2022). Pada uji aktivitas antimikroba isolat terhadap *Candida albicans* tidak terdapat aktivitas antijamur. Struktur penyusun dinding sel *Candida albicans* lebih kompleks karena tersusun dari polisakarida (mannan, glukukan, kitin), protein dan lipid dengan membran sel di bawahnya yang mengandung sterol (Kobayashi *et al.*, 1994).

Berdasarkan hasil uji aktivitas antimikroba, isolat BL2 yang memiliki daya hambat terbesar dan dilanjutkan untuk diidentifikasi molekuler. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa gen isolat BL2 terseparasi dan sejajar dengan marka 1300 bp (Gambar 2). Hal ini mengindikasikan bahwa fragmen gen yang teramplifikasi memiliki ukuran ± 1300 bp yang sesuai dengan ukuran nukleotida dari gen 16S rRNA yaitu sekitar 1500 bp (Akihary & Kolondam, 2020).

Setelah sekuens sampel BL2 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>). Analisis hasil BLAST memberikan informasi dan memverifikasi mengenai organisme atau bakteri apa yang mempunyai kesamaan dengan urutan DNA sampel sehingga dapat digunakan untuk identifikasi bakteri. 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. *Max identity* adalah nilai tertinggi dari persentasi identitas atau kecocokan antara sekuen query dengan sekuen database yang tersejajarkan. Setelah sekuens sampel BL2 dicocokkan dengan sekuens database pada BLAST, diperoleh hasil bahwa isolat BL2 yaitu memiliki tingkat kesamaan panjang nukleotida pada database 100% dan memiliki kecocokan sekuens 100% dengan *Bacillus altitudinis* (Gambar 3).

Bacillus altitudinis adalah bakteri anaerob, Gram positif yang berbentuk batang yang tersebar luas di alam. Bakteri ini menghasilkan berbagai enzim yang dapat digunakan di industri farmasi (Asmani *et al.*, 2020).

SIMPULAN

Isolat bakteri endofit yang berasal dari batang pauh (BL2) memiliki potensi antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan dapat diidentifikasi secara molekuler dengan Gen 16S rRNA dengan nama spesies *Bacillus altitudinis*.

REFERENSI

- Akihary, C. V., & Kolondam, B. J. (2020). Pemanfaatan gen 16S rRNA sebagai perangkat identifikasi bakteri untuk penelitian-penelitian di Indonesia. *Pharmacoin*, 9(1), 16. <https://doi.org/10.35799/pha.9.2020.27405>
- Anggiastanti, F., & Hilda Putri, D. (2020). Optimization of Starter in Producing Antibacterial Compounds by *Andaleh (Morus macrourea) Endophytic Bacteria B.J.TA-6 Isolate*. 5(1), 11–14.
- Asmani, K.-L., Bouacem, K., Mechri, S., & Jaouadi, B. (2020). Identification and characterization of *Bacillus altitudinis* strain KA15 newly isolated from the highest summit of the Djurdjura Mountains in Kabylia, Algeria. *MOL2NET, International Conference Series on Multidisciplinary Sciences*, 6, 1–6. <http://sciforum.net/conference/mol2net-06>
- Castillo, U., Harper, J. K., Strobel, G. A., Sears, J., Alesi, K., Ford, E., Lin, J., Hunter, M., Maranta, M., Ge, H., Yaver, D., Jensen, J. B., Porter, H., Robison, R., Millar, D., Hess, W. M., Condrón, M., & Teplow, D. (2003). Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiology Letters*, 224(2), 183–190. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00426-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00426-9)
- Fitmawati, A., Suwita, N., & Sofiyanti, H. (2013). Eksplorasi dan karakterisasi keanekaragaman plasma nutfah mangga (*Mangifera*) di Sumatera Tengah. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung, September 2013*, 307–312.
- Kobayashi, H., Matsuda, K., Ikeda, T., Suzuki, M., Takahashi, S. I., Suzuki, A., Shibata, N., & Suzuki, S. (1994). Structures of cell wall mannans of pathogenic *Candida tropicalis* IFO 0199 and IFO 1647 yeast strains. *Infection and Immunity*, 62(2), 615–622. <https://doi.org/10.1128/iai.62.2.615-622.1994>
- Pandur, Ž., Dular, M., Kostanjšek, R., & Stopar, D. (2022). Bacterial cell wall material properties determine *E. coli* resistance to sonolysis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105919>
- Safira, U. M., Pasaribu, F. H., & Bintang, M. (2017). Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Potensinya sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri. *Current Biochemistry*, 1(1), 51–57. <https://doi.org/10.29244/cb.1.1.51-57>
- Sutton, J. A. F., Carnell, O. T., Lafage, L., Gray, J., Biboy, J., Gibson, J. F., Pollitt, E. J. G., Tazoll, S. C., Turnbull, W., Hajdamowicz, N. H., Salamaga, B., Pidwill, G. R., Condliffe, A. M., Renshaw,

- S. A., Vollmer, W., & Foster, S. J. (2021). Staphylococcus aureus cell wall structure and dynamics during host-pathogen interaction. In *PLoS Pathogens* (Vol. 17, Issue 3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009468>
- Yandila, S., Hilda Putri, D., & Fifendy, M. (2018). Kolonisasi Bakteri Endofit pada Akar Tumbuhan Andaleh (*Morus macroura* Miq.). *Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Padang*, 04(2), 61–67.