

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFIT
TANAMAN TAMAN NASIONAL DI PULAU JAWA SEBAGAI AGEN PENGHASIL
ANTIBIOTIK

Sri Yuwantiningsih

*) Akademi Pertanian Yogyakarta

ABSTRAK

Bakteri endofit adalah potensial sumber antibiotik yang sekarang banyak dikaji. Penelitian ini mengisolasi bakteri endofit dari tanaman hutan di Pulau Nusakambangan dan tanaman di Taman Nasional Ujung Kulon, Kebun Raya Bogor, Kaliurang, Meru Betiri dan Baluran. Penelitian ini bertujuan melakukan isolasi-seleksi dan identifikasi bakteri endofit dengan kemampuan menghambat mikrobia indikator *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* dan *Fusarium oxysporum*. Penelitian ini melakukan identifikasi isolat – isolat unggul penghasil antibiotik.

Seleksi berdasar kemampuan tumbuh dari berbagai media dan menghasilkan daya hambat terhadap mikrobia indikator. Hasil menunjukkan bahwa terdapat 4 isolat dengan daya hambat >5.5 yaitu BIN-1, KLP-1, STG-1 dan OOH-1. Isolat unggul terpilih adalah STG-1 dan OOH-1 dalam kaitan aplikasi di bidang pertanian dan kesehatan manusia. Identifikasi pendahuluan senyawa antibiotik dilakukan dengan membandingkan polaritas senyawa antibiotik terhadap berbagai eluen. Isolat unggul terpilih adalah isolat STG-1 dan OOH-1 dengan spektrum patogenitas luas dan daya hambat tinggi.

Identifikasi molekuler 16S-rRNA menggunakan primer 27F dan 1492R. Hasil ditunjukkan dengan analisis similaritas dengan data pada GeneBank menggunakan program Blast-N, dan konstruksi pohon filogeni dengan hasil isolat STG-1 sebagai *Pseudomonas brenneri* SFML 97-391 dengan nilai similaritas 99% dan isolat OOH-1 adalah *Enterobacter xiangfangensis* dengan nilai similaritas 99%.

Kata kunci : Antibiotik, Bakteri Endofit, Seleksi, Karakterisasi, Taman Nasional P.Jawa

PENDAHULUAN

Langkah baru pencarian antibiotik terfokus pada kajian tentang bioaktivitas mikrobia endofit saat ini, setelah pencarian asal sumber mikrobia tanah, rizosfer dan mikrobia lain yang diisolasi dari permukaan tanaman sulit untuk mendapatkan yang baru (He et al., 2009). Mikrobia endofit adalah mikrobia yang hidup didalam jaringan tanaman, hidup bersama-sama tanaman dalam berbagai kondisi tanaman, memungkinkan untuk menghasilkan senyawa dengan bioaktivitas tinggi. Jenis, karakter dan ekosistem tumbuhan yang beraneka ragam berpeluang untuk menghasilkan senyawa antibiotik dengan jenis bioaktivitas yang lebih beragam. Hasil penelitian melaporkan, tanaman sumber mikrobia endofit yang menghasilkan bioaktivitas tinggi dapat ditemukan pada tanaman hutan hujan tropis, tanaman endemik

tumbuh di suatu wilayah, tanaman yang secara turun temurun telah digunakan dalam pengobatan dan tanaman tua dan tidak dieksplorasi lagi (*wild and unexplored species*)(Strobel, 2003).

Antibiotik baru senantiasa dibutuhkan karena timbulnya resistensi dalam pemberantasan patogen dan munculnya penyakit-penyakit baru sebagai akibat berkembangnya populasi manusia di bumi dan perkembangan teknologi yang ditemukan. Penggunaan teknologi dalam transplantasi organ-organ manusia dan hewan, penyakit baru akibat perubahan perilaku manusia dan penyakit baru akibat perubahan cuaca dan iklim yang ekstrem, mengakibatkan antibiotik yang telah ada kemudian tidak dapat dipergunakan lagi. Antibiotik asal bakteri endofit dapat diperoleh dalam waktu yang lebih singkat karena bakteri memiliki *doubling time*

yang lebih pendek ,biaya relatif lebih murah karena melalui teknologi fermentasi yang lebih sederhana dibandingkan dengan sintesis antibiotik secara kimia. Beberapa peneliti melaporkan bahwa bakteri endofit penghasil senyawa bioaktif dapat ditemukan diantaranya pada genus *Cellomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium* dan *Mycobacterium* isolat asal tanaman budidaya dan tanaman padang rumput(Zinniel *et al.*,2002). *Bacillus mojavensis* isolat asal tanaman jagung(Snook *et al.*, 2009). Bakteri endofit genus *Phyllobacterium* hasil isolasi dari *Epimedium brevicornu* (He *et al.*, 2009).

Bioaktivitas isolat bakteri endofit asal tanaman hutan dan tanaman Taman Nasional di pulau Jawa dikaji pada penelitian ini dalam aplikasi antibiotik dibidang pertanian dan kesehatan manusia. Habitat tanaman pada lokasi tersebut mengalami tekanan lingkungan dan kompetisi nutrisi yang tinggi, sebagaimana tanaman hutan hujan tropis dan tanaman dengan kondisi hutan yang dikonservasi di Taman-taman Nasional di Indonesia. Pada habitat tersebut akan diperoleh isolat bakteri dengan kemampuan menghasilkan senyawa antibiotik dengan kemampuan bioaktif tinggi. Isolat bakteri endofit diseleksi berdasar kemampuan tumbuh pada berbagai media dan menimbulkan daya hambat terhadap mikrobial indikator *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* dan *Fusarium oxysporum*. *Bacillus subtilis* adalah bakteri penyebab beberapa penyakit pada manusia, *Candida albicans* penyebab penyakit diantaranya adalah infeksi pada vulvovaginal dan oesophagus sedangkan *Fusarium oxysporum* adalah jamur patogen pada tanaman budidaya seperti padi ,melon, tomat dan tanaman hias seperti anggrek. Isolat unggul diseleksi berdasar nilai daya hambat dan spektrum patogenitas yang luas terhadapmikrobial indikator. Identifikasi

bakteri endofit terpilih penghasil antibiotik unggul dilakukan secara morfologi, fisiologi-biokimia serta uji API dan analisis sequence 16S rRNA dengan program BLAST NCBI. Hasil analisis sequence dibandingkan dengan visualisasi pohon filogeni.)

BAHAN DAN METODE

Tanaman Sumber Isolat Bakteri

Tanaman sumber isolat bakteri endofit berasal dari tanaman hutan dari P. Nusakambangan dan tanaman pada beberapa Taman Nasional yaitu : Ujung Kulon, Kebun Plasma Nutfah Indonesia (Kebun Raya Bogor), Kaliurang, Merubetiri dan Baluran, dikoleksi pada bulan Maret 2013. Sampel berupa ranting tanaman sepanjang 10 cm, dimasukkan dalam plastik berperekat dan disimpan dalam ice box untuk dibawa ke laboratorium. Identifikasi tanaman dilakukan berdasarkan data hasil identifikasi dari masing- masing Taman Nasional dan dari Kunci Determinasi Tumbuhan

Isolasi Bakteri Endofit

Isolasi Bakteri endofit dilakukan asal 273 sampel tanaman diambil,berdasarkan pada metode Strobel *et al.*, 2003 dengan sedikit modifikasi. Sampel berupa ranting tanaman dipotong sepanjang 3 sentimeter dilNutrienAgar dalam petridis dan diinkubasi 5 menit, kemudian dikeringanginkan selama 3-5 menit, dipindahlkan ke akuadest selama 2 menit kemudian ethanol 70% selama 1-2, dibelah secara aseptis tumbuakukan sterilisasi permukaan dengan memasukkan kedalam larutan Chlorox 5% h dan ditumbuhkan diatas medium pada suhu 28 derajat Celsius selama24 jam. Kolonibakteri yang maing-masing dimurnikan diinkubasi selama 24-48 jam pada medium Nutrien Agar miringdankemudian disimpan pada lemari es sebagai kultur stok yang akan digunakan dalam penelitian.



Gambar 1. Lokasi Pengambilan Samp Pengujian aktivitas anti mikrobia

Kultur murni isolat bakteri dipindahkan dan ditumbuhkan dalam medium Nutrien cair, Glucose and yeast extract (GY) dan Antibiotik-3, diinkubasikan selama 24 jam untuk digunakan pada uji aktivitas bakteri. Dengan metode paperdisc, kertas paper disc dicelupkan kedalam kultur bakteri dan diletakkan diatas medium Nutrien Agar dalam petridisk yang telah ditambahkan dengan biakan mikrobia indikator

diatasnya. Medium dan cara inkubasinya disesuaikan dengan mikrobia indikator yang digunakan. Pengujian aktivitas mikrobia dilakukan selama 48 jam dan pengamatan dilakukan terhadap munculnya zona bening sebagai indikator terjadinya penghambatan oleh isolat bakteri endofit terhadap mikrobia indikator, diameter penghambatan diukur sebagai diameter zona bening yang terbentuk (Gambar2).



Gambar 2. Isolasi bakteri endofit dari tanaman Santogi dan Orok-orok hutan.

Identifikasi pendahuluan senyawa antibiotik

Seleksi dilakukan pada hasil pengujian aktivitas antimikrobia, Hasil diameter zona penghambatan diseleksi sebagai isolat unggul. Isolat unggul diseleksi jika, memiliki daya hambat >2 (Petrini, *et al* 1997). Senyawa antibiotik yang ditemukan dianalisis pendahuluan dengan metode *paperdisc diffusion technique* berdasar pada polaritas

senyawa antibiotik terhadap beberapa eluen yaitu A. NH₄ Cl, B.(air yang dijenuhi dengan n- Butanol) C. (n- Butanol : Asam asetat: Air = 3 : 2 :1) D. (Aseton : n-Butanol Air = 5:3:1), E. Asam asetat yang dijenuhi air (Margino, 2008).

Identifikasi bakteri endofit

Identifikasi bakteri dilakukan berdasar pada karakter fenotipik maupun genotipik. Karakter fenotipik meliputi karakter morfologi-fisiologi-biokimia dan

dengan uji API, sedangkan karakter genotip merupakan analisis sequence 16S rRNA. Isolasi DNA kromosom bakteri dilakukan dengan metode Prospieech and Neumann (1995). Amplikasi gen 16S rRNA menggunakan primer 27F dan 1492R dengan kondisi denaturasi awal 94 C selama 2 menit, 40 siklus pada 29 C selama 30menit, 51 C selama 30 menit dan 17 C selama 1 menit dan akhir pada akhir siklus pada 72 C selama 10 menit. Produk PCR dideteksi dengan elektrophoresis dengan gel agarose 2%. Visualisasi dilakukan dengan sinar UV, produk PCR 16S r RNA dengan manual prosedur menggunakan sekuencer DNA dan analisis menggunakan BLAST-Ndalam NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Konstruksi pohon filogeni dilakukan dengan membandingkan temuan sequence 16 S rRNA isolat bakteri dengan data base Gene Bank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Pohon filogeni dikonstruksikan dengan program Phylip versi 3.5 dengan neighbor-joining algorithm dan visualisasi dengan program beberapa pohon.

HASIL DAN PEMBAHASAN
Isolasi bakteri endofit dari beberapa spesies tanaman

Total sebanyak 366 isolat bakteri endofit yang dikoleksi dari 273 sumber

tanaman hutan dari P. Nusakambangan Jawa Tengah dan tanaman asal lima Taman Nasional yaitu : Ujung Kulon, Kebun Plasma Nutfah Indonesia (Kebun Raya Bogor)Jawa Barat, Kaliurang (DIY), Meru betiri- Jember dan Baluran-Situbondo Jawa Timur. Lokasi pengambilan sampl seperti di P.Jawa seperti pada gambar peta lokasi pada Gambar 1. Isolasi dari tanaman dilakukan pada bagian ranting tanaman yang cukup tua dengan asumsi akan diperoleh populasi bakteri yang lebih banyak dibanding pada pucuk tanaman atau ranting yang masih muda. Pada tanaman yang masih muda terdapat populasi yang lebih sedikit. (Margino,2008). Isolat yang telah diisolasi diuji kemampuan menghasilkan antibiotik yang mampu membunuh atau menghambat mikrobia indikator *Bacillus subtilis*,*Candia albicans* dan *Fusarium oxysporum*. Penelitian Meliawati (2006) di beberapa hutan di P. Sumatra ,P. Jawa dan P.Bali dari 126 tanaman diperoleh sebanyak 238 isolat bakteri dan 42% diantaranya memiliki kemampuan antipatogen terhadap jamur dan bakteri. Isolasi bakteri pada tanaman *Lycopersicum esculentum* dengan komposisi tertentu dari Gujarat India, diperoleh 18 isolat dengan kemampuan antifungi. (Patel *et al.*, 2012).

Tabel 1. Jumlah isolat penghasil antibiotik pada medium Nutrien cair, Glucose Yeast extract dan Antibiotik-3 terhadap indikator *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*.

	Medium	Kode Isolat	Daya hambat		
			<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>F. oxysporum</i>
1	Nutrien cair	KLP-1	5		3,6
2	Nutrien cair	TGP-1	4,6		
3	Nutrien cair	AMP-1	4,6		
4	Nutrien cair	KBY-1	3,8		
5	Nutrien cair	NGK-1	3		
6	Nutrien cair	BIN-1	5,8	3	
7	Nutrien cair	SMN-1	2,8		
8	Nutrien cair	TRG-1	2,6	3	
9	Nutrien cair	AGT-1	3		
10	Nutrien cair	SWN-1	4		
11	Nutrien cair	MDN-1	5		
12	Nutrien cair	SLM-1	6		
13	GY	KLY-1	3	3,6	2,8
14	GY	WGU-1	2		4
15	GY	CMB-1		4	3

16	GY	WRC-1	3	3	
17	GY	KLR-1	5		
18	GY	OOH-1	4	4	6
19	GY	STG-1		4	6
20	GY	CMB-2		4,3	
21	GY	CUR-1		4,6	
22	Antibiotik 3	STL-1		4	4
23	Antibiotik 3	KLC-1	2,7		
24	Antibiotik 3	MTG-1	3	3,8	4
25	Antibiotik 3	KLY-2	2,8	3	3
26	Antibiotik 3	CMB-1			2,8
27	Antibiotik 3	PPH-1	2,1	4	4
28	Antibiotik 3	TDE-1			4

Seleksi senyawa antibiotik dengan cara bioassay

Seleksi isolat bakteri endofit dilakukan setelah isolat ditumbuhkan pada medium fermentasi. Isolat yang telah diisolasi ,diuji kemampuan menghasilkan antibiotik yang mampu menghambat sebagai pemicu dan pemacu produksi antibiotikseperti, Nutrien cair, glucose and yeast extract (GY) dan Antibiotik-3. Produksi antibiotiki asal mikrobia telah dilakukanpada berbagai medium yang memberi gambaran sumber nutrisi. Seleksi terhadap kelompok jamur endofit yang pernah dilakukan menggunakan medium potato dextrose broth (PDA), GY dan Antibiotik-3 (Margino, 2008). Pada penelitian ini, seleksi dilakukan pada kelompok bakteri,dan menggunakan medium Nutrien

cair, diasumsikan bahwa bakteri merupakan kelompok yang lebih sederhana dibanding kelompok jamur. Hasil uji kemampuan tumbuh dengan menghasilkan daya hambat terhadap mikrobia indikat, diketahui bahwa, medium Nutrien cair merupakan medium yang lebih baik dalam menghasilkan senyawa antibiotik penghambat dibanding dengan medium GY dan Antibiotik-3 dalam menghasilkan daya hambat terhadap *Bacillus subtilis*, Medium GY menghasilkan pengaruh daya hambat yang hampir sama yaitu terhadap *Bacillus subtilis* dan *Candida albicans*, sedangkan medium Antibiotik-3 merupakan medium yang mampu menimbulkan daya hambat yang lebih baik bagi *Candida albicans* dan *Fusarium oxysporum* (Tabel I).

Tabel 2. Jumlah isolat penghasil senyawa antibiotik dalam medium Nutrien cair, GY dan Antibiotik 3 dengan indikator *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* dan *Fusarium oxysporum*.

Medium	Mikrobia Indikator		
	<i>B.subtilis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>F.oxysporum</i>
Nutrien cair	54	13	7
GY	25	26	7
Antibiotik 3	7	13	11

Prosentase hasil penjarangan isolat menggunakan medium Nutrien cair dengan medium Nutrient cair yaitu $74/366 \times 100\% = 24\%$, dengan medium GY adalah $58/366 \times 100\% = 16\%$ dan dengan medium Antibiotik-3 adalah $31/366 \times 100\% = 14\%$. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan medium yang berbeda dalam proses fermentasi akan berpengaruh pada senyawa antibiotik yang dihasilkan (Tabel 2). Beberapa peneliti melaporkan penemuan hasil penjarangan isolat bakteri

endofit asal batang tanaman kopi diantaranya pada tanaman kopi *Coffea arabica* dan *Coffea robusta*, diperoleh 57% memiliki bioaktivitas fitopatogen (Shiomi *et al.*,2006). Penelitian Meliawati (2006) melaporkan aktivitas fitopatogen ditemukan pada 42 % isolat bakteri endofit asal tanaman hutan dari beberapa wilayah di P.Sumatra,P.Jawa dan P.Bali dengan medium cair Nutrient Broth.Prosentase penjarangan isolat dari penelitian ini diperoleh hasil yang lebih

sedikit. Hasil tersebut memberi indikasi bahwa lebih sedikit populasi bakteri yang dapat menghasilkan senyawa penghambat mikrobia indikator yang diujikan pada penelitian ini.

Bioassay untuk penetapan seleksi menggunakan mikrobia indikator *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* dan Paper disc. *B. subtilis* yang digunakan berukuran 0.6 mm, Hasil penghambatan terhadap *Fusarium oxysporum*. *B. subtilis* yang memiliki diameter > 2 mm sebanyak 20 isolat, Tabel II. Sebelas isolat unggul dalam aplikasi di bidang pertanian dan kesehatan manusia dengan daya hambat >4 dan empat diantaranya memiliki nisbah daya hambat >5.5 mm., Tabel II Isolat BIN-1 memiliki nisbah penghambatan 5.8 mm terhadap *Bacillus subtilis* dan 3 mm terhadap *Candida albicans*. Isolat SLM-1 dan KLR-1 memiliki nisbah daya hambat terhadap *Bacillus subtilis* saja, isolat OOH-1 dengan nisbah daya hambat 6 terhadap *Fusarium oxysporum* dan 4 terhadap *Candida albicans* dan isolat STG-1 memiliki nisbah daya hambat 6 terhadap *Fusarium oxysporum* dan 4 terhadap *Candida albicans*. Medium yang mengandung glukosa, yeast extract dan gliserol adalah medium yang dapat digunakan untuk meningkatkan produksi antibiotik. Beberapa penelitian telah menggunakan glukosa 0.5 % dan yeast extract 0.1 % dalam medium untuk memproduksi senyawa antibiotik miklamicin (Igarashi *et al.*, 2011). Medium yeast potato dextrose (YPD) juga digunakan untuk memproduksi antibiotik macrotetrolide, sebagai D-medium dengan komposisi yeast extract 0.2 %, malt extract 0.5 %, dextrose 0.2 % (Tebbets *et al.*, 2013). Antibiotik pyrolidone dihasilkan oleh isolat yang ditumbuhkan pada medium Nutrient Agar yang dimodifikasi dengan kandungan : (g/l: glucose 4, yeast extract 2.5, peptone 5 dan beef extract 2) (Sathiyarayanan, *et al.*, 2014). Selain itu ditambahkan (g/l : glucose 1.0 dan yeast extract, 0.534 g/l dan precusornatrium decanoate 0.6 g/l per

hari) untuk memacu biosintesis antibiotik daptomycin (Son *et al.*, 2014). Dalam proses metabolisme mikrobia pada umumnya glucose dan glycerol merupakan substrat potensial untuk dirubah menjadi asam piruvat lewat glycolysis pathway dan acetyl Ko-A yang dibutuhkan dalam siklus asam trikarboksilat (TCA cycle) untuk proses respirasi, pertumbuhan dan biosintesis metabolit sekunder termasuk antibiotik (Cheeptam, 1999). Isolat unggul dengan daya hambat tinggi dan memiliki kemampuan spektrum patogenitas yang luas kemudian ditetapkan sebagai isolat unggul terpilih. Untuk dilakukan identifikasi pendahuluan senyawa antibiotik dan identifikasi strain bakteri secara lengkap.

Identifikasi Pendahuluan Senyawa Antibiotik

Hasil karakterisasi senyawa antibiotik dengan teknik kromatografi dilakukan dengan berbagai eluen disajikan pada Tabel III. Teknik kromatografi ini berbasis pada tingkat polaritas senyawa antibiotik dan beberapa senyawa yang dikandung dalam larutan ekstraseluler di berbagai medium. Nilai R_f menggambarkan kunci macam dan jumlah senyawa antibiotik yang bersangkutan. Angka polaritas adalah sifat fisik antibiotik terhadap eluen, sehingga polaritas pelarut atau eluen menentukan jarak pergerakan bercak dari tempat totolan. mencapai jarak tertentu dan nilai ini dikenal sebagai retardation force (R_f), sesudah dibandingkan dengan jarak dimana titik elusi diakhiri (Margino, 2008). Antibiotik yang dihasilkan oleh isolat BIN-1 mampu menghambat *Bacillus subtilis* dan *Candida albicans* memiliki nilai R_f 0.70 setelah dielusi dengan NH₄Cl dan nilai R_f 0.95 setelah dielusi dengan air yang dijenuhi n-Butanol, n-Butanol : Asam Acetat Air=3:1:1 dan Aceton : N-Butanol ; Air= 5:4:1 dengan R_f 0.95 sehingga untuk memanen senyawa antibiotik BIN-1 dapat menggunakan campuran senyawa tersebut. Terdapat tiga nilai R_f yang berbeda memberi indikasi bahwa antibiotik BIN-1

memiliki 2 jenis senyawa aktif yang berbeda. Antibiotik STG-1 efektif terhadap *Candida albicans* dan *Fusarium oxysporum* memiliki nilai Rf 0.82 jika dielusi dengan NH₄ Cl dan 0.90 jika dielusi dengan air yang diuap *n-Butanol*, sedangkan antibiotik WYU-1, KLR-1, mampu menghambat *Bacillus subtilis* namun nilai Rf belum diketahui dengan kelima jenis eluen, hal serupa pada antibiotik PPH-1 efektif terhadap *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* dan *Fusarium oxysporum* dan isolat TDE-1 menghasilkan daya hambat terhadap *Fusarium oxysporum* belum menunjukkan nilai Rf setelah dielusi dengan kelima jenis eluen tersebut, sehingga tidak muncul pada penelitian ini. antibiotik OOH-1 efektif terhadap *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* dan *Fusarium oxysporum* dengan

nilai Rf 0.9 dapat dielusi dengan satu jenis eluen yaitu Asam asetat yang diuap air, diindikasikan sebagai satu jenis antibiotik dengan spektrum patogenitas yang luas. Beberapa antibiotik seperti penisilin rosamisin, cephalosporin N dan cephalosporin P dapat diidentifikasi dengan menggunakan eluen *n-Butanol* : Asam asetat : Air = 3:1:1, terdapat perbandingan campuran pada cephalosporin P yakni = 12:3:5 dengan pelarut sama. Isolat unggul dipilih berdasarkan nilai daya hambat antibiotik terhadap mikroba indikator dan rencana aplikasinya di sektor pertanian kesehatan. Sektor pertanian diwakili oleh *Fusarium oxysporum* dan sektor kesehatan diwakili oleh *Bacillus subtilis* dan *Candida albicans*, oleh karena itu dari Tabel II dapat dipilih diantaranya dan STG-1, OOH-1.

Tabel III. Nilai RF antibiotik yang dielusi dengan eluen ABCDE dan mikroba indikator *B.subtilis*, *C.albicans* dan *F.oxysporium*.

No	Kode Isolat	Mikroba Indikator	Nilai RF antibiotik dalam eluen dan mikroba indikator <i>B.subtilis</i> , <i>C.albicans</i> , <i>F.oxysporium</i>				
			A	B	C	D	E
1	KLP-1	<i>B.subtilis</i>	0,90				
2	SLM-1	<i>B.subtilis</i>	0,95				
3	AMP-1	<i>B.subtilis</i>		0,90			0,60; 0,90
4	BIN-1	<i>B.subtilis</i>	0,70	0,95	0,90		
5	WGU-1	<i>B.subtilis</i>					
6	MDN-1	<i>B.subtilis</i>	0,70		0,90		
7	KLY-1	<i>C.albicans</i>		0,75			0,90
8	CMB-1	<i>C.albicans</i>		0,95			
9	WRC-1	<i>C.albicans</i>		0,95			
10	KLR-1	<i>C.albicans</i>					
11	OOH-1	<i>C.albicans</i>					0,80
12	CMB-2	<i>C.albicans</i>			0,80; 0,80		
13	STG-1	<i>C.albicans</i>	0,82	0,90			
14	CUR-1	<i>F.oxysporium</i>					
15	STL-1	<i>F.oxysporium</i>					
16	MTG-1	<i>F.oxysporium</i>				0,99	0,90
17	CMB-3	<i>F.oxysporium</i>		0,80; 0,70			
18	PPH-1	<i>F.oxysporium</i>					
19	TDE-1	<i>F.oxysporium</i>					

Identifikasi Bakteri

Identifikasi dilakukan berdasar karakter morfologi, fisiologi, biokimia dan uji API20 NE adalah berdasar karakter fenotip. Isolat STG-1 diidentifikasi sebagai *Pseudomonas luteola* dengan nilai similaritas 99 %, isolat OOH-1

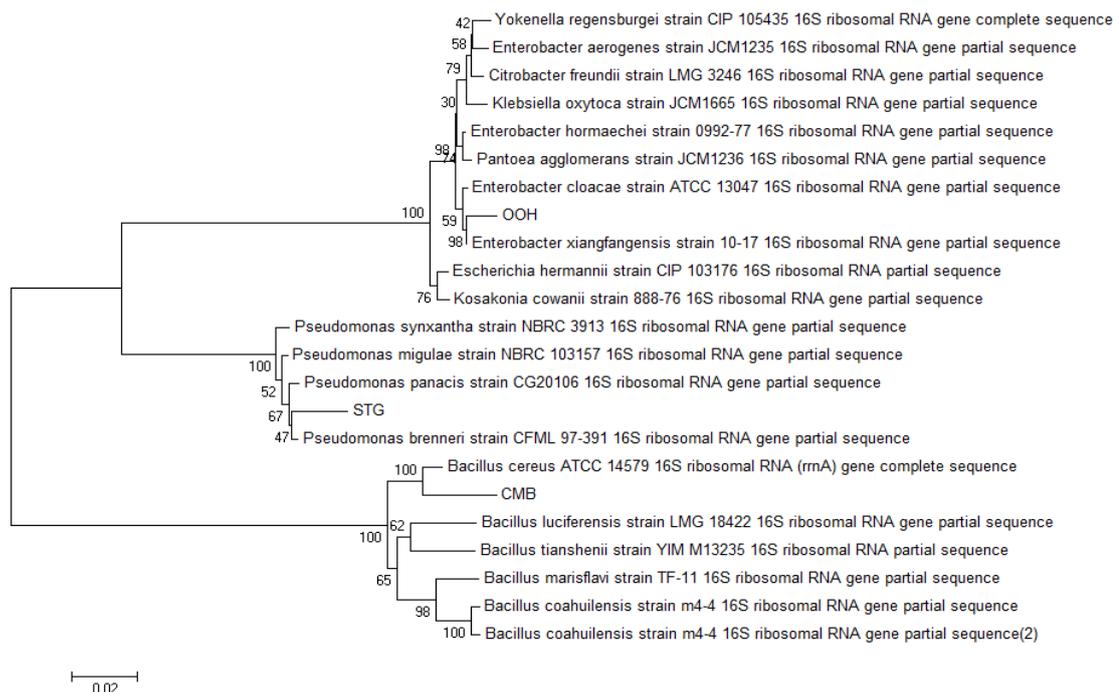
Pseudomonas luteola dengan nilai similaritas 86.7 %. Dengan nilai similaritas yang kurang dari 99% maka isolat OOH-1 tidak dapat dikelompokkan sebagai *Pseudomonas luteola*. Identifikasi dapat dilakukan dengan uji API yang lain, beda dari yang telah dipergunakan.

Sebagaimana diketahui tipe kit API 20NE dipergunakan bagi kelompok bakteri *Non-Enterobacter*. Dapat diasumsikan bahwa spesies bakteri OOH-1 adalah merupakan kelompok *Enterobacter*, sehingga tidak muncul identifikasinya dengan Kit API 20NE yang diperuntukkan bagi kelompok *Non - Enterobacter*. Identifikasi berdasar karakter molekular dengan sequence 16SrRNA akan dikaji untuk menemukan nama strain OOH-1.

Identifikasi molekular dengan analisis sequence 16S rRNA adalah identifikasi berdasar karakter genotip. Hasil identifikasi dilaporkan bahwa berdasar pada karakter tersebut maka isolat bakteri endofit STG-1 adalah *Pseudomonas brenneri* dengan nilai similaritas 99 %. Hasil karakterisasi genotip menunjukkan hasil yang berbeda dengan hasil identifikasi berdasarkan pada karakter fenotip. Didalam taksonomi nama belakang dari nama spesies adalah sebagai *specific epithet* dapat merupakan karakter khusus yang dimiliki suatu spesies, seperti ciri warna, lokasi, fungsi dan beberapa sifat reaksi fisiologis dan biokimiawi. Sifat tersebut memiliki peluang untuk berubah jika berada pada lingkungan mengalami perubahan, sebagaimana lingkungan yang

yang relatif tidak stabil di alam (Holt et al., 1994). Karakter molekular adalah karakter yang bersifat lestari karena merupakan karakter yang tersimpan didalam gen. (Atlas, 1997). Hasil analisis tersebut dapat disimpulkan bahwa nama spesies bakteri isolat STG-1 yang lebih akurat adalah *Pseudomonas brenneri*. Isolat OOH-1 hasil analisis sequence 16SrRNA adalah *Enterobacter xiangfangensis*. Hasil analisis sequence 16S rRNA menggunakan program BLAST-N, seperti pada Tabel IV.

Data hasil analisis *gene sequence* kedua isolat bakteri kemudian dibandingkan dengan beberapa data *gene sequence* beberapa data spesies bakteri. Pada kelompok 1 terdiri dari *Pseudomonas migulae* strain CIP 105 470, *Pseudomonas panacis* strain C62010 dan *Pseudomonas protoalatica* strain CMS 64, *Pseudomonas brenneri* strain CFML 97-391 dan *Pseudomonas synxantha* strain NBRC 3913. Kelompok 2 terdiri atas *Enterobacter xiangfangensis* strain 10-17, *Enterobacter hormaechei* strain 0992-77 dan *Enterobacter cloacae* strain ARCC 13047. Hasil analisis *gene sequence* ditunjukkan dengan pohon filogeni adalah seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. Dendrogram yang menunjukkan hubungan kemiripan antara strain bakteri endofit penghasil antibiotik dan 5 strain acuan genus *Pseudomonas* dan 3 acuan genus *Enterobacter* didasarkan atas nilai similaritas SS_M dari algoritma UPGMA sequence 16S-Rrna

Isolat STG-1 adalah satu kelompok dengan *Pseudomonas brenneri* strain CMFL.97-391 dan *Pseudomonas proteolytica* strains CMS 64, sedangkan isolat OOH-1 adalah satu grup dengan *Enterobacter xiangfangensis* strain 10-17. Dari hasil analisis tersebut dapat disimpulkan bahwa Isolat STG-1 adalah sebagai *Pseudomonas brenneri* strain CFML.97-391 dan isolat OOH-1 sesuai dengan *Enterobacter xiangfangensis* strain 10-17. Karakter molekular adalah karakter yang lebih *conserved* pada mahluk hidup karena merupakan karakter genetis yang spesifik yang berbeda dengan species yang lain dan sangat sedikit perubahan selama evolusinya. (Atlas, 1997).

Daftar Pustaka

- Atlas, R.M. 1997. *Principles of Microbiology*. 2nd ed. Wm C. Brown Publisher. Dubuque. Iowa
- Cheepatam, at, 1990. Studies on Antifungal Antibiotic foom *Ellishiodhotis inquinans* L 1588-A8. Master Thesis. Department of Agricultural Chemistry, Graduate School of Agriculture, Hokaido University, Sapporo Japan.
- He. R.I, Wang. G.P., Liu. X.H., Zhang, C.L and Lin.F.C. 2009. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from *Epimedium brevicornu* Maxim African Journal of Biotechnology. 8. (2): 191-195.
- Holt, J.G.; Krieg N.R.; Staley, J.T and Williams, S.T. 1994 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* ninth edition Lippincott Williams and Wilkins. A Wolter Kluwer Company Philadelphia-Baltimore-New York-London.
- Margino S., 2008. Produksi metabolit sekunder (antibiotik) oleh jamur endofit. *Majalah Farmasi Indonesia*. 19:86-94
- Meliawati R, Widyaningrum D.N., Djohan A.C., Sukiman H., 2006. Pengkajian Bakteri Endofit Penghasil Senyawa Bioaktif untuk Proteksi Tanaman. *Jurnal Biodiversitas*. 7(3) 221-224.
- Patel., H.A, Khristi., SM, Perikh. K, Rajeram G. 2012. Isolation and Characterization of Bacterial endophytic from *Lycopersicon esculentum* Plant and Their Plant Promoting Characteristics. Nepal. *Journal. of Biotechnology*. 2 (1):37-52.
- Shiomi. H.F, Silva.H.S, Melo, Nunes.F.V and Bettiol. W. 2006. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust *Journal of Science Agriculture* 63: 32-39.
- Snook. ME., Mitchell. T., Hinton. D.M., and Bacon. C.W., 2009. Isolation and Characterization of Leu7-Surfaction from the Endophytic Bacterium *Bacillus Mojavensis* RRC. 101. A Biocontrol Agent for *Fusarium verticilloides*. *Journal of agricultural and food chemistry*: 57:P. 4287- 4292.
- SonNg I ; Ye.C.; Zhang, Z ; Lu, Y ,Ind Jing, K.(2014). Daptomycin antibiotic production processes in fed-batch fermentation by *Streptomyces roseosporus* NRRL. 11379 with precursor effect and medium optimization. *Journal of Bioprocess Biosynthesis Engineering* .37 : 415-423
- Strobel G & Daisy B. 2003. Bioprospecting for Their Natural Product. *Society for Microbiology*. 47. 4. 491-502.

Tebbetts B, Yu Z., Stewart D, Zhao LX, Jiang YL, Qu LH, Andes D., Shen B, Klein B., 2013. Identification of antitungal natural products via *Saccharomyces cerevisiae* bioassay : insight in to macrotetrolide drug spektrum, potency and mode of action. *Journal of Medical Mycology*. 51:280-289.

Zinniel, D.K. Lambrecht; Harris, N. B.; Fang, Z; Kuczmarks, I.D.:Higley, P; Ishimaru, C; Arunakumari, A; Barletta, R. G.; Vidaver, A. K. 2002. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizi Bacteria from Agronomic Crops and Praire Plant. *Applied Environment Microbiology*. 68 (5): 2198- 2108.