Guplin, Dwi Soelistya D.J. dan Lalu Zulkifli. Program Studi Magister Pendidikan IPA, Program Pascasarjana Universitas Mataram

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi jenis bakteri endofit pada kulit batang tanaman terap *(Artocarpus elastiscus)*  yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri isolat klinik *Staphylococcus aureus, Escherichi coli*, *Salmonella typhi* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Tahapan penelitian ini adalah (1) isolasi bakteri endofit dari kulit batang tanaman terap, (2) uji antibakteri (uji daya hambat) terhadap bakteri isolat klinik, (3) uji biokimia isolat bekteri endofit yang memiliki daya hambat, (4) identifikasi isolat bakteri endofit yang memiliki daya hambat secara molekuler. Dalam penelitian ini diperoleh 34 isolat kulit batang tanaman terap dan 12 isolat mempunyai daya hambat terhadap *S. aureus*. Berdasarkan identifikasi molekuler dengan 16S rRNA isolat bakteri endofit kulit batang tanaman terap teridentifikasi sebagai bakteri *Bacillus cereus, Bacillus subtilis* dan *Bacillus amyloliquefaciens.* Tiga jenis bakteri endofit tanaman terap ini dapat dikembangkan sebagai penghasil senyawa antibakteri.

Kata Kunci : Kulit batang terap, bakteri endofit, identifikasi, antibakteri

ABSTRACT

 Guplin, Dwi Soelistya D.J. dan Lalu Zulkifli. Program Studi Magister Pendidikan IPA, Program Pascasarjana Universitas Mataram.

*E-mail*: adlyfurqon@gmail.com

This study aims to identify the types of endophytic bacteria on the bark of terap (*Artocarpus elasticus*) capable of inhibiting the growth of clinical isolate bacteria of *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella typhi*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Stages of this study were (1) isolating the endophytic bacteria from the bark of terap plants (2) antibacterial test (inhibition test) against clinical isolate bacteria, (3) biochemical test upon endophytic isolate bacteria showing strong inhibition effect, (4) moleculer identifcation upon endophytic bacteria isolate showing strong inhibition effect. From this study, it was obtained 34 barks of terap isolates, and 12 isolates have inhibitory effect on *S. aureus*. Based on 16S rRNA molecular identification, the isolate of endophytic bacteria of the barks were identified as *Bacillus cereus, Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens.* Those endophytic bacteria of Terap plants are potentially to be developed as a the producer of antibacterial compounds.

Keywords: Terap bark, endophytic bacteria, identification, antibacteria

**BAB I**

**PENDAHULUAN**

 Bakteri endofit merupakan bakteri saprofit yang hidup dan berasosiasi dengan jaringan tanaman tanpa menimbulkan suatu gejala penyakit pada tanaman tersebut. Keberadaan bakteri-bakteri endofit di dalam jaringan tanaman berperanan dalam perbaikan pertumbuhan tanama, memfiksasi nitrogen, memobilisasi fosfat, dan berperanan dalam kesehatan tanaman. Bakteri endofit mampu meningkatkan sistem pertahanan tanaman terhadap gangguan penyakit tanaman karena kemampuannya untuk memproduksi senyawa antimikroba, enzim, asam salisilat, etilena dan senyawa sekunder lainnya yang berperanan menginduksi ketahanan tanaman (Backman dan Sikora, 2008). Endofit sebagai sumber yang tak terbatas untuk memproduksi senyawa berkhasiat obat yang ditemukan mengandung senyawa antimikroba, antivirus, antikanker, antioksidan, antidiabetes dan immunosuppressant (Strobel, 2002).

 Salah satu famili tumbuhan di hutan tropis yang berpotensi sebagai sumber bahan kimia bioaktif dan jumlahnya relatif besar adalah Moraceae. Famili Moraceae adalah Artocarpus yang terdiri dari 50 spesies dan tersebar mulai dari Asia Selatan, Asia Tenggara hingga kepulauan Solomon, kepulauan Pasifik, Australia Utara dan Amerika Tengah. Di Indonesia banyak ditemukan misalnya di pulau Kalimantan terdapat 25 spesies, 13 spesies di antaranya endemik, namun baru dua spesies yang dimanfaatkan yaitu : *A. heterophyllus* dan *A. integer* (Hakim, 2011). Sejumlah spesies Artocarpus banyak menghasilkan senyawa golongan terpenoid, flavonoid, dan stilbenoid. Keunikan struktur metabolit sekunder pada Artocarpus menghasilkan efek yang sangat luas, antara lain sebagai anti bakteri (Khan *et al.*, 2003),

 Terap termasuk tanaman genus Artocarpus, memiliki genus yang sama dengan sukun (*A. communis)*, keluwih (*A. camansi)*  dan nangka (*A. altilis)*. Secara morfologi terap memiliki persamaan sifat dengan keluih dan sukun. Getah terap dapat digunakan sebagai palut untuk menangkap burung, sebagai obat disentri dan daunnya jika dicampur dengan nasi digunakan sebagai obat batuk. Biji tanaman ini dapat dimakan setelah digoreng dan dibuat minyak goreng serta dapat digunakan sebagai minyak rambut wanita (Heyne, 1987)

 Berdasarkan pemikiran dan kajian pustaka diatas perlu dilakukan isolasi bakteri endofit pada kulit batang terap, menguji daya hambat bakteri endofit terhadap bakteri isolat klinik *S. aureus, E. coli*, *S. typhi* dan *P. aeruginosa* dan mengidentifikasi bakteri endofit yang memiliki daya hambat.

**METODE**

 Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKIP Universitas Mataram dan Unit Riset Biomedik RS. Propinsi Nusa Tenggara Barat. Jenis penelitian deskriptif eksploratif dengan cara mengisolasi bakteri endofit dari kulit batang tanaman terap yang di ambil dari hutan wisata desa Sesaot kecamatan Narmada Lombok Barat Nusa Tenggara Barat dan menguji daya hambat bakteri endofit terhadap bakteri isolat klinik *S. aureus, E. coli*, *S. typhi* dan *P. aeruginosa,* masing-masing isolat diuji atau diulang sebanyak tiga kali,untuk mengetahui kemampuannya sebagai anti bakteri, selanjutnya melakukan identifikasi bakteri endofit yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri isolat klinik. secara molekuler dengan 16S rRNA.

**Isolasi bakteri endofit dari kulit batang terap**

Sampel (kulit batang) tanaman terap dalam keadaan segar dibersihkan dengan air mengalir kemudian dipotong-potong sepanjang ±5 cm. Potongan sampel tersebut kemudian disterilisasi permukaannya dengan direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit, Natrium Hipoklorit 4% selama 5 menit, dan dibilas dengan aquades dan dikeringkan dalam laminar air flow. Potongan sampel yang sudah disterilisasi dipotong-potong sepanjang 0,5 cm pada setiap bagian sisinya kemudian ditanam (posisi berdiri) dalam media NA. Media yang sudah mengandung sampel tersebut diinkubasi pada suhu 32oC. Bakteri endofit yang tumbuh, dimurnikan.

**Uji daya hambat dengan metode sumuran**

 Kultur Isolat bakteri endofit murni diambil 2 lop/ ose dimasukkan pada medium cair 10 ml NB steril di *vortex* 5 menit*,* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 32oC, digoyang selama 24 jam dalam 150 putaran/menit. disentrifugasi pada 5000 g selama 30 menit, sehingga dihasilkan supernatant. Bakteri uji yang sudah disegarkan dibuat pengenceran dengan mencampurkan 1 ose suspensi bakteri patogen ke dalam tabung reaksi yang telah berisi NaCl 0,9%. Dihomogenkan menggunakan vortex dan kekeruhannya distandarisasi dengan CFU 105. Larutan bakteri yang telah distandarisasi tadi, dioleskan ke media MHA dengan rata dengan menggunakan sweb dari kapas yang streril. Membuat lubang/sumuran pada media MHA dengan diameter 6 mm. Kemudian masukkan supernatant ± 50 µl ke dalam setiap lubang media MHA yang telah diinokulasi bakteri patogen dan *Cyprofloxasin*  sebagai kontrol positip dan *Aquades* sebagai kontrol negatif dilakukan 3 kali ulangan. Luas zona hambatdidapatkan denganmenjumlahkan diameter zona hambat masing-masing isolat bakteri endofit sebanyak tiga kali ulangan dan menentukan rata-ratanya

**Uji Fisiologi (Biokimia)**

 Uji fisiologi yang dilakukan adalah Uji motilitas, uji katalase, uji indol ,uji hidrolisis urea, uji simmon sitrat, uji voges proskauer (vp), uji metil red , uji hidrolisis pati. Uji fermentasi karbohidrat dan uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

**Identifikasi Molekuler**

 Ekstrasi DNA dilakukan dengan mengambil satu (1) ose sampel bakteri endofit ditambah 200 µl DNA Zol di vortex selama 1 menit, ditambahkan etanol 100% sebanyak 100 µl dan didiamkan selama 5 menit. Disentrifugasi 12.000 g selama 4 menit kemudian dicuci sebanyak 2 kali dengan etanol 80% sebanyak 200 µl dan didiamkan selama 4 menit. Disentrifugasi pada 9000 g selama 2 menit. Dilarutkan pada aquades 40 µl dan disimpan pada -200C sampai saat digunakan.

 **Amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR**

 Primer Universal 16S-rRNA yang digunakan adalah Primer 63f (5’-CAG GCCTAA CACATG CAA GTC) dan 1387r (5’-GGG CGG WGT GTA CAAGGC) (Marchesi *et al.,*1998). Dalam tabung PCR dimasukkan 2x PCR Master Mix Solution 10 µl, Template DNA 1-2 µl, Primer 63f 1 µl, Primer 1387r 1 µl, Aquades 6-7 µl. Selanjutnya tabung PCR dimasukkan dalam mesin PCR Bio Rad ( Resti *et al.*, 2013).

**Elektroforesis**

 Pada tahap elektroforesis, sebanyak 4 µl produk PCR ditambahkan dengan 2 µl *Loading buffer* (Bromphenol-blue dan Cyline Cyanol). Di elektroforesis pada 2% gel agarose dalam buffer TAE (0,5 gram agarose ditambah dengan 50 ml TAE) yang telah di isi sebanyak 4 µl *etidium bromide* (EtBr). Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 V dan kuat arus sebesar 400 A selama 30 menit. Marker yang di pakai adalah 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Hasil elektroforesis divisualisasi di bawah sinar ultraviolet dan di foto dengan menggunakan Gel Doc/Bio Rad (Resti *et al*, 2013).

**Skuensing**

 Produk PCR yang diperoleh selanjutnya disekuensing di 1stBASE Malasia melalui PT Genetika Science Jakarta. Data sekuens di edit dengan menggunakan Clustal W dalam program MEGA 5 dan hasilnya dibandingkan dengan sekuens yang ada pada Gene Bank dengan menggunakan fasilitas BLAST search yang terdapat pada situs NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). (Resti *et al*, 2013).

**ANALISIS DATA**

 Hasil identifikasi isolat bakteri endofit yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen, dilakukan melalui analisis sekuen gen 16S rRNA menggunakan metode bioinformatika secara *online*. Hasil skuensing dibandingkan dengan data gen 16S rRNA yang terdapat pada data base Gene Bank NCBI. Data yang ada secara kualitatif ditabulasikan dalam bentuk tabel dan gambar dan dianalisis secara deskriptif.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Bakteri Endofit Kulit Batang Tanaman Terep**

 Bakteri endofit dari kulit batang terap diperoleh dari hutan wisata desa Sesaot kecamatan Narmada kabupaten Lombok Barat Nusa Tenggara Barat adalah sebanyak 34 isolat bakteri endofit.

**Aktivitas Daya Hambat Bakteri Endofit**

 Tiga puluh empat (34) isolat bakteri endofit hasil isolasi dari kulit batang terap (*A. elasticus*) di uji terhadap 4 jenis bakteri patogen yakni *S. aureus, E. coli*, *S. typhi* dan *P. aeruginosa*. Hasil uji daya hambat yang didapat menunjukkan bahwa 12 isolat bakteri endofit terap (ET), hanya mampu menghambat *S.aureus*  ( Tabel 1).

 Tabel 1 : Hasil uji daya hambat Isolat bakteri endofit terap terhadap

 *S. aureus.*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| No | KodeIsolat  | **Rata-rata luas Zona hambat untuk tiga kali ulangan (mm)** |
| Bakteri Uji(*S. aureus)* | Kontrol (+ )*Cyprofloxacin* | Kontrol ( –)*Aquades* |
| 1 | ETA | 16,33 | 39.33 | - |
| 2 | ETB | 14,16 | 39,33 | - |
| 3 | ETC | 14,83 | 39,33 | - |
| 4 | ETD | 14,50 | 39,33 | - |
| 5 | ETE | 14,83 | 38,33 | - |
| 6 | ETF | 14,83 | 38,33 | - |
| 7 | ETG | 16,83 | 38,33 | - |
| 8 | ETH | 15,33 | 28,33 | - |
| 9 | ETI | 17,33 | 39,00 | - |
| 10 | ETJ | 15,66 | 39,00 | - |
| 11 | ETK | 15,33 | 39,00 | - |
| 12 | ETL | 15,83 | 39,00 | - |

 Isolat bakteri endofit terap hanya mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus,* hal ini disebabkan *S. aureus* mempunyai [membran plasma](https://id.wikipedia.org/wiki/Membran_plasma) tunggal, dinding sel tebal berupa peptidoglikan yang permiabilitasnya tinggi jika dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Sekitar 90 persen dinding sel tersebut tersusun oleh  [peptidoglikan](https://id.wikipedia.org/wiki/Peptidoglikan) sedangkan sisanya berupa molekul lain bernama [asam teikhoat](https://id.wikipedia.org/w/index.php?title=Asam_teikhoat&action=edit&redlink=1). Di sisi lain, bakteri Gram negatif memiliki sistem membran ganda, membran plasmanya diselimuti oleh membran luar permeabel. Bakteri ini mempunyai dinding sel tipis berupa peptidoglikan, yang terletak di antara membran dalam dan membran luarnya sehingga lebih sulit diserang antibiotik (Medigan 2006)

 Luas zona hambat tertinggi pada ETI sebesar 17,33 mm dan terendah pada isolat ETB sebesar 14,16 mm. Mengacu kepada kreteria ukuran zona hambat menurut Susanto *et al.,* (2012) ukuran 11 – 20 mm termasuk sensitif. Dengan menggunakan standar ini isolat-isolat bakteri endofit pada kulit batang terap dapat tergolong memiliki daya hambat yang kuat atau sensitif.

**Identifikasi isolat bakteri endofit**

 Identifikasi 2 isolat bakteri endofit kulit batang terap (*A. elasticus*) yang mempunyai daya hambat terhadap bakteri isolat klinik dilakukan pengamatan morfologi (cat Gram), uji biokimia dan uji molekuler. Hasil pengamatan morfologi dan uji biokimia disajikan pada tabel 2

**Cat Gram isolat bakteri endofit**

 Cat Gram pada bakteri endofit dari kulit batang terap yang mempunyai daya hambat didapatkan bahwa 12 isolat tersebut adalah tergolong bakteri berbentuk batang dan termasuk bakteri gram positif. Dua belas isolat bakteri endofit kulit batang terap, yang di dapat merupakan bakteri Gram positif dengan bentuk basil (batang) pendek ujung tumpul, persegi panjang dan batang panjang berspora dan terlihat ada yang tunggal, bergandengan dan berantai. Salah satu contoh hasil pengecetan gram terhadap 12 isolat bakteri kulit batang terap pada gambar 1



 d

 s

 d p

Gambar 1. Foto hasil cat Gram isolat ETK bakteri endofit tanaman terap

 dengan perbesaran 1000 x,

Keterangan : Etk:Endofit terap kode K, d : Diameter satu sel bakteri

p : Panjang satu sel bakteri, s : Spora bakteri

**Karekteristik Biokimia isolat bakteri endofit**

 Uji biokimia bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri endofit dalam memberikan respon terhadap keberadaan zat atau senyawa tersebut. Uji biokimia pada penelitian ini meliputi uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar),* uji Simmon sitrat*,* uji hidrolisis urea, uji motilitas, uji karbohidrat (Glukosa, Sukrosa, Laktosa, Maltosa, Manosa), uji indol, uji katalase, uji hidrolisis pati, uji metil red, dan uji voges-proskauer. Hasil uji biokimia dapat dilihat pada Tabel 2

Tabel 2 : Hasil uji biokimia isolat bakteri endofit terap



Keterangan :

A : Asam, B: Basa, (+): Ada atau terbentuk (-): Tidak ada (±): Ada tapi Lemah

Strac : Hidrolisis Pati, VP: voges-proskauer, TSIA: Triple Sugar Iron Agar, MR: Metil Red

 Hasil uji fisiologi menunjukkan 12 isolat bakteri endofit berbentuk batang tunggal atau bergandengan termasuk Gram positif, sebagia besar membentuk spora, memiliki warna koloni putih agak krem. Hasil uji motilitas, maltosa, menitol,katalase, VP (voges-proskauer) dan uji hidrolisis pati semua Isolat bakteri endofit kulit batang tanaman terap menunjukkan hasil positif, glukosa semua isolat positif kecuali pada isolat ETG. Semua isolat tidak enghasilkan enzim urease, tidak menghasilkan gas dan enzim triptonase.

**Analisis Molekuler 16S rRNA**

 Identifikasi spesies bakteri endofit secara molekuler dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu isolasi/ ekstraksi DNA, Amplifikasi DNA dengan PCR, elektroforesis dan sekuensing. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan DNAzol (*Guanidium Isothiocyana*), kemudian DNA yang diperoleh di simpan pada suhu -20oC. Hasil ekstraksi DNA dilanjutkan dengan Amplifikasi gen 16S rRNA dengan menggunakan Primer 63f dan 1387r. Proses PCR terdiri dari *denaturasi* pada suhu 94oC selama 30 detik, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 55oC selama 30 detik dan ekstensi (*extention*) pada suhu 72oC selama 45 detik. Hasil Amplifikasi di elektroforesis pada gel agarosa yang diamati di bawah UV transiluminator. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 V dan kuat arus 400 A selama 30 menit. Hasil penelitian memperlihatkan adanya pita DNA penyandi gen 16S rRNA dengan ukuran ± 1324 bp setelah dibandingkan dengan DNA marker (100 bp DNA ladder) (Gambar 2).

 M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

 

1324 bp

100 bp

300 bp

500 bp

1000 bp

1500 bp

 Gambar 2: Hasil elektroforesis amplifikasi 16S rRNA isolat bakteri endofit kulit batang tanaman terap (*A. elasticus*), DNA marker (100 bp DNA ladder (M).ETC(3 ), ETD(4 ), ETE(5 ), ETF(6 ), ETG ( 6), ETH( 7), ETI( 8), ETJ(10 ), ETK(11 ), ETL(12 ),

Tabel 3: Jarak evolusi antara bakteri endofit kulit batang tanaman terap dengan bakteri standard/rujukan yang diakses dari genbank

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| No  | Isolat bakteri endofit | Jarak Evolusi | Bakteri Referensi/kekerabatan  |
| 1 | ETA | 0,000 | *Bacillus cereus Jl.* |
| 2 | ETB | 0,000 | *Bacillus cereus Jl.* |
| 3 | ETC | 0,000 | *Bacillus cereus Jl.*  |
| 4 | ETD | 0,000 | *Bacillus cereus Jl.* |
| 5 | ETE | 0,000 | *Bacillus cereus Jl.* |
| 6 | ETF | 0,000 | *Bacillus cereus Jl.* |
| 7 | ETH | 0,000 | *Bacillus cereus Jl.* |
| 8 | ETJ | 0,000 | *Bacillus cereus Jl.* |
| 9 | ETK | 0,000 | *Bacillus cereus Jl.* |
| 10 | ETL | 0,000 |  *Bacillus cereus Jl.* |
| 11 | ETI | 0,034 | *Basillus subtilis* PanD37 |
| 12 | ETG | 0,143 | *Bacillus amyloliquefaciens*DQ993675 |

 Isolat\_Endofit Terap (ETL)

 Isolat\_ Endofit Terap (ETK)

 Isolat\_ Endofit Terap (ETJ)

 Isolat Endofit Terap (ETH)\_

 Isolat\_ Endofit Terap (ETF)

 Isolat\_ Endofit Terap (ETE)

 Isolat\_ Endofit Terap (ETD)

 Isolat\_ Endofit Terap (ETC)

 Isolat\_ Endofit Terap (ETB)

 Isolat\_ Endofit Terap (ETA)

 EU871042.1\_Bacillus\_cereus\_JL

 FJ859700.1\_Bacillus\_pseudomycoides\_BIHB\_360

 KF010791.1\_Bacillus\_mycoides\_B38V

 AY904032.1 Bacillus infantis SMC 4352-1

 DQ408589.1 Bacillus megaterium DZ011

 DQ374637.1 Bacillus acidiceler CBD 119

 Isolat\_ Endofit Terap (ETG)

 KC443079.1 Bacillus coagulans BAB-2432

 EF433410.1\_Bacillus\_licheniformis\_BCRC\_11702

 DQ993675.1 Bacillus amyloliquefaciens BCRC 17038

 Isolat\_ Endofit Terap (ETI )

 KP635214.1\_Bacillus\_subtilis\_PanD37

 NR\_116017.1\_Bacillus\_subtilis\_BCRC\_10255

 DQ993674.1\_Bacillus\_subtilis\_BCRC\_10058

 KX622632.1\_Staphylococcus\_sp.\_BAB-5902

 L14016.1\_Bacillus\_sphaericus

 NR\_115605.1\_Lactobacillus\_plantarum\_JCM\_1149

 KX826954.1\_Streptococcus\_sp.\_ING2-D5A

 Y15986.1\_Clostridium\_sp.\_RCel1

 U81871.1\_Pseudomonas\_sp.\_BI\*8

 LC069032.1\_Escherichia\_coli\_JCM\_1649

 KX500307.1\_Klebsiella\_sp.\_KSC\_16S

99

99

98

65

69

47

51

56

37

71

29

34

55

25

98

86

0.02

 Gambar : Pohon filogenitik 12 isolat bakteri endofit tanaman terap.

 Hasil sekuensing gen 16S rRNA diolah dengan menggunakan program BioEdit. Data hasil BioEdit tiap isolat dianalisis similaritasnya dengan data di *GenBank*. Data sekuen gen 16S rRNA dari isolat bakteri endofit kulit batang tanaman kemudian dibandingkan dengan beberapa data sekuen dari gen 16S rRNA (Gambar 3). Hasil perbandingan sekuensing ini kemudian divisualisasikan dalam bentuk pohon filogenetik berdasarkan jarak evolusi atau jarak genetik (Tabel 3) dengan menggunakan program MEGA 6 yang dapat menunjukkan kekerabatan isolat sampel dengan sekuen yang diperoleh .

 Berdasarkan Gambar 3 dan Tabel 3 , terkait hasil analisis filogenetik dengan menggunakan softwere MEGA 6 (Tamura *et al.,* 2013) untuk 12 Isolasi bakteri endofit dari kulit batang terap (*A. elasticus*) diperoleh dua klaster besar yaitu kelompok pertama didominasi oleh genus Bacillus dan Streptococus, sedangkan klaster kedua lebih dominan *Clostridium sp*. dan *Pseudomonas sp.*

 Duabelas Isolat bakteri endofit kulit batang terap (*A. elasticus*) teridentifikasi ada tiga jenis bakteri yaitu *B.cereus,* adalah isolat ETA, ETB, ETC, ETD, ETE, ETF, ETH, ETJ, ETK dan ETL tergolong *Bacillus cereus*. Isolat ETI tergolong *Bacillus subtilis* sedangkan ETG sebagai *Bacillus amyloliquefaciens* karena berdasarkan dendogram pada gambar 3 menujunkkan isolat ETG terpisah dengan isolat yang lain dan jarak kemiripan urutan DNA dengan bakteri *B. amyloliquefaciens* adalah 0,143

 Untuk isolat ET1 menurut pohon filogenetik jarak kekerabatan dan distance terdekat adalah dengan bakteri *Bacillus subtilis* dengan distance adalah 0,036 yang kalau di persentasekan tingkat kesamaan antara bakteri *Bacillus subtilis* dengan Isolat ETI adalah 99 % yang berarti Isolat ETI satu species dengan *Bacillus subtilis.*

 Pembuktian bahwa ETA, ETB, ETC, ETD, ETE, ETF, ETH, ETJ, ETK dan ETL adalah dengan mencocokkan urutan DNA isolat tersebut dengan berbagai macam urutan DNA yang diperoleh dari Gen Bank, isolat pertama yang di cocokkan adalah ETA ternyata jarak yang terdekat adalah 0,000 ditemukan pada bakteri *B. cereus* kemudian sisanya juga dicocokan dengan berbagai jenis gen bakteri bacil dan jaraknya lebih dari 0,002 berarti mereka bukan satu species, kemudian dicocokkan dengan ETA ternyata ETB, ETC, ETD, ETE, ETF, ETH, ETJ, ETK dan ETL memiliki nilai distance 0,000 yang berarti 100 % dapat dinyatakan ke sepuluh isolat ini adalah satu species yakni species *Bacillus cereus*  (Tamura *et al., 2013)*

 *B. cereus* merupakan bakteri Gram positif, memiliki warna koloni putih agak krem dan berbentuk batang (*bacil*). Bakteri ini menghasilkan spora yang berbentuk elips, sporanya hanya terbentuk bila terdapat oksigen dilingkungan sekitar (aerob fakultatif). *B. cereus* termasuk salah satu organisme mesofilik yaitu dapat tumbuh pada suhu optimal 30o - 35 o C. Bakteri yang dapat menghasilkan spora lebih tahan terhadap tekanan lingkungan yang ekstrim karena metabolisme selnya terhenti atau dormansi jika berada pada lingkungan yang buruk (Jenson dan Moir 2003).

 *B. subtilis* diketahui dapat memproduksi tiga macam enzim protease, yaitu protease asam, netral dan alkali. Enzim protease netral yang berasal dari *B.subtilis* stabil pada pH 6,5 - 10 dan diinhibisi oleh etilen amin tetraasetat dengan pH optimum 7,2 - 7,6 *B. subtilis* telah banyak digunakan untuk kegiatan uji genetik dan biokimia dan selama beberapa dekade, bakteri ini dan dinyatakan sebagai bakteri endospora tergolong Gram-positif (Sonenshein *et al.,* 2001)

Hal ini sesuai dengan hasil pengamatan biokimia dan pengamatan hasil cat gram bakteri isolat ETG berbentuk batang dan tergolong bakteri gram positif karena isolat ini berwarna ungu dan mempunyai panjang 1,55 µm dan lebar atau ketebalan 0,56 µm dengan ukuran ini jelas isolat ETG berbentuk batang dengan demikian sudah dapat di pastikan sebagai bakteri gram positif.

**Manfaat Bakteri Endofit Bagi Tanaman Inang dan Bagi Bakteri Isolat Klinik.**

 Keberadaan bakteri endofit dalam jaringan tanaman inang sangat bermanfaat bagi tanaman inang dan bakteri itu sendiri. Bakteri endofit dalam jaringan tanaman hidup dan melakukan metabolisme, dalam proses metabolisme bakteri endofit mendapatkan bahan baku dari tanaman tanpa mengganggu proses metabolisme tanaman, sebaliknya hasil sampingan metabolisme sangat bermanfaat bagi tanaman.

 Lodewyckx *et al*., (2002) menyatakan bahwa beberapa bakteri endofit menghasilkan enzim deaminase asam 1-aminosiklopropane -1- karboksilik. Enzim tersebut berperan dalam pembentukan etilen pada tanaman. Etilen pada tanaman disintesa ketika tanaman menghadapi tekanan lingkungan, baik biotik maupun abiotik. Simbiosis endofit dengan tanaman mampu meningkatkan adaptasi tanaman terhadap lingkungan yang kurang menguntungkan. Kemampuan tanaman bertahan hidup pada tanah-tanah yang terkontaminasi logam berat adalah berkat adanya endofit yang memiliki kemampuan mendegradasi, mengeliminasi, atau menggunakan logam-logam tersebut dalam sistem metabolismenya (Aly*.*, 2011). Pada kasus tertentu keberadaan bakteri endofit juga mampu berperan sebagai *‘disease-suppressive soils’*. Saat ini *Bacillus moj*av*ensis* merupakan bakteri yang dipatenkan sebagai bakteri endofit yang mempunyai peran penting dalam melindungi tanaman dari serangan patogen penyebab penyakit sekaligus meningkatkan pertumbuhan tanaman dalam kondisi kering (drought tolerance) (Bacon dan Hinton, 2002).

**Prospek Mikroba Endofit kulit batang Terap Dalam Penemuan Senyawa-Senyawa Bioaktif**

 Kim *et al*. (2002) melaporkan bahwa bakteri endofit *Bacillus lentimorbus* menghasilkan senyawa alphadan beta-glucosidase yang bersifat anti jamur sehingga mampu menghambat pertumbuhan patogen *Botrytis cinerea*. Bakteri tersebut juga digunakan untuk melindungi tanaman kentang dari infeksi *Fusarium* s*ambucinum ,* karena adanya senyawa volatile yang bersifat racun bagi jamur tersebut (Sadfi *et al*.,2001); Chérif *et al*., 2003). *B. cereus* yang umum ditemukan sebagai bakteri endofit pada kapas (*Gossypium hirsutum*), jagung manis (*Zea mays*), dan tanaman jeruk (*Citrus* spp.) ternyata mampu menghasilkan chitinase untuk mendegradasi dinding sel jamur patogen seperti *F. sambucinum* (Sadfi *et al*., 2001).

 Bakteri endofit yang berhasil di isolasi dari kulit batang terap teridentifikasi sebagai *B. cereus* dan *B.subtilis* mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *S.aureus.* Kemampuan ini disebabkan karena bakteri mampu menghasilkan metabolit sekunder yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri potegen ini.. Menurut Tan dan Zou (2000), bakteri endofit dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang karakternya mirip atau sama dengan senyawa yang diproduksi oleh tumbuhan inangnya.

 *S. aureus*. dapat menyebabkan keracunan makanan, gejala keracunan biasanya cepat dan akut, tergantung pada daya tahan tubuh dan banyaknya toksin yang termakan. Jumlah toksin yang dapat menyebabkan keracunan adalah 1,0 μg/gr makanan. Gejala keracunan ditandai oleh rasa mual, muntah-muntah, dan diare yang hebat tanpa disertai demam (Jawetz *et al.,* 2005). Berdasarkan uji daya hambat 12 isolat bakteri endofit kulit batang terap *(A. elasticus*) memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri isolat klinik *S. aureus,* dengan kenyataan ini bakteri endofit dari hasil penelitian ini dapat dikembangkan untuk dijadikan sebagai senyawa antibakteri untuk mengobati berbagai jenis penyakit yang diakibatkan oleh bakteri *S.aureus.*

**Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitin dan kajian literatur serta pembahasan maka dapat di simpulkan bahwa .

1. Dua belas Isolat bakteri endofit kulit batang tanaman terap *(A. elasticus)* mampu menghambat pertumbuhan bakteri isolat klinik *S. aureus*.

2. Jenis bakteri endofit tanaman terap yang mampu menghambat pertumbuhan isolat klinik adalah *Bacillus cereus, Bacillus subtilis dan Bacillus amyloliquifaciens.*

3. Bakteri endofit  *Bacillus cereus, Bacillus subtilis* pada kulit batang tanaman terap *(A. elasticus)* dapat dikembangkan sebagai senyawa antibakteri untuk mengobati berbagai penyakit yang di timbulkan oleh bakteri isolat klinik *S. aureus*.

4. Bakteri endofit *B. subtilis*  pada tanaman terap *(A. elasticus)* memiliki daya hambat yang paling tinggiang paling tinggi

**DAFTAR PUSTAKA**

.

Aly A. H., A. Debbab, and P. Proksch. 2011. *Fungal endophytes: unique plantinhabitants with great promises*. Appl Microbiol Biotechnol. **90:**1829–1845

Backman PA, Sikora RA. 2008. Endophytes: an emerging tool for biological control. Biol Control. *46(1):1-3. doi:10.1016/j.bio control.2008.03.009*

Chirife, J., Herszage, L., Joseph, A, & Kohn, E. S., 1983, In Vitro Study of Bacterial Growth Inhibition in Concentrated Sugar Solutions: Microbiological Basis for the Use of Sugar in Treating Infected Wounds, *Journal Antimicrobial Agent and Chemotherapy,* 766-773*.*

Hakim , A. dan Jufri, A. W., 2011. Aktifitas Anti Malaria dan Analisis Metabolit Sekunder Kayu dan Kulit Batang A*rtocarpus odoratissimus blanco*. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Jurusan FMIPA: Universitas Mataram

Heyne, K.,1987.Tumbuhan Berguna Indonesia.Badan Litbang Kehutan Jakarta

 Jawetz M; Adelberg’s. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran* edisi 23. Alih Bahasa: Huriwati Hartanto dkk. Jakarta, Penerbit Buku Kedokteran ECG.

Jenson I, Moir CJ (2003) *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Ch 14 In: Hocking AD (ed) Foodborne microorganisms of public health significance. 6th ed, Australian Institute of Food Science and Technology (NSW Branch), Sydney, p. 445–478.

Khan, M.R., Omaloso,A.D.,Kihara, M.,(2003) *antibacterial activity of Artocarfus heterophlus*, Fitoterapia 74,501-505

Kim, K. J. A.; Y. J. Yang, and J. Kim. 2002. Production of alpha-glucosidase inhibitor by beta-glucosidase inhibitor producing *Bacillus lentimorbus* B-6. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **12**: 895-900.

Lodewyckx, C . J. Vangronsveld, F. Porteous, E. R.B. Moore, S. Taghavi, M.Mezgeay, and D. van der Lelie. 2002. EndophyticBacteria and Their Potential Applications.

Madigan, MT., Martinko, JM. And Parker, J.(1999) *Biology of Microorgansm* Eight Edition Prentice Hall Intemational, Inc.New York, San Francisco, Boston USA

Marchsi JR,Soto T, Waighmant AJ. Fry,JC, Hion SJ,Wade Wage. 1998. Design *and evaluation of useful bacterium-specefic PCR primer that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA*. Appl Environ.Mikrobial 64:795-5

Resti Z, Habazar T, Putra DP, Nasrun. 2013. Skrining Dan Identifikasi Isolat Bakteri Endofit Untuk Mengendalikan Penyakit Hawar Daun Bakteri Pada Bawang Merah. *J. HPT Tropika. ISSN 1411-7525. Vol. 13, No. 2: 167 –178.*

.Sadfi, N.; M. Cheri; I. Fliss; A. Boudabbous, and H. Antoun. 2001. Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *Journal of Plant Pathology* **83**: 101-118.

Strobel, G.A. 2002. Microbial gifts from rain forests. Can. J. Plant Pathol., 24: 14-20

Sonnenschein AL, Losick R, Hoch JA (1993) *Bacillus subtilis and Others Gram-Positive Bacteria*: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. AmericanSociety for Microbiology, Washington, DC

Susanto, D. Sudrajat dan R. Ruga. 2012. Studi kandungan bahan aktif tumbuhan meranti merah (*Shorea leprosula* Miq) sebagai sumber senyawa antibakteri. *Mulawarmnan Scientifie 11(2): 181-190*

Tan, R.X., and W.X. Zou. 2001. Endophytes : a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep*. 18: 448-459.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.