

Isolation and Identification of Endophytic Bacteria from *Ficus variegata* Blume as Antibacterial Compounds Producer

(Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Tumbuhan Nyawai (*Ficus variegata* Blume) sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri)

Shinta Leonita^{1*}, Maria Bintang¹, Fachriyan Hasmi Pasaribu²

¹Department of Biochemistry, Bogor Agricultural University, Bogor, 16680, Indonesia

²Departement of Animal Infectious Disease and Veterinary Public Health, Bogor Agricultural University, Bogor, 16680, Indonesia

Received : 04 June 2015; Accepted: 21 October 2015

Corresponding author: Shinta Leonita; Departemen Biokimia, Jl. Agatis Gd. Fapet Lt. 5, Wing 5, Bogor 16680; Telp/ Fax. +62251-8423267; E-mail: leonitashinta@yahoo.co.id

ABSTRACT

Endophytic bacteria can produce antibacterial compounds. Their existence in the medicinal plant of Ficus variegata Blume enables the production of bioactive compounds similar to those contained by the host plants. The purpose of this study was to isolate and identify endophytic bacteria from F. variegata which is potential to produce antibacterial compounds. The methods used include isolation of endophytic bacteria from leaves, stem, aerial root, and fruit of F. variegata plants. Antibacterial activity assay was done against four types of bacteria i.e. Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, and Pseudomonas aeruginosa. Identification of endophytic bacteria was conducted based on morphological analysis, biochemical test, and molecular analysis of 16S rRNA. Endophytic bacterial culture was extracted by ethyl acetate and analyzed by GC-MS. A total of 29 isolates of endophytic bacteria were obtained from F. variegata. The BH2 isolate was found to have potential activity. Analysis of 16S rRNA showed that BH2 isolate was related to Pseudomonas aeruginosa strain SV1 with 99% identity. The result of GC-MS analysis showed that the antibacterial compound was Nonanoic acid ethyl ester.

Keywords: antibacterial, endophytic bacteria, *Ficus variegata* Blume, identification

ABSTRAK

Bakteri endofit dapat memproduksi senyawa antibakteri. Keberadaannya pada tumbuhan nyawai (Ficus variegata Blume) memungkinkannya memproduksi senyawa bioaktif seperti yang terkandung oleh tumbuhan inangnya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri endofit dari tanaman nyawai yang berpotensi sebagai penghasil senyawa anti-

bakteri. Metode yang dilakukan dengan mengisolasi bakteri endofit dari daun, batang, akar napas, dan buah tumbuhan nyawai. Uji aktivitas antibakteri terhadap empat jenis bakteri uji yaitu *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Identifikasi bakteri endofit dilakukan berdasarkan karakter morfologi, uji biokimia dan analisis molekuler 16S rRNA. Kultur bakteri endofit diekstraksi dengan pelarut etil asetat dan dianalisis menggunakan GC-MS. Sebanyak 29 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari tumbuhan nyawai. Berdasarkan uji aktivitas antibakteri diperoleh isolat BH2 yang memiliki aktivitas potensial. Analisis 16S rRNA menunjukkan isolat BH2 memiliki presentase kemiripan dengan *Pseudomonas aeruginosa* strain SV1 sebesar 99%. Hasil analisis GC-MS menunjukkan senyawa antibakteri yaitu Nonanoic acid ethyl ester.

Kata kunci: antibakteri, bakteri endofit, *Ficus variegata* Blume, identifikasi

1. PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah terbesar dalam dunia kesehatan. Adanya resistensi antibiotik oleh bakteri penyebab infeksi tersebut menuntut penemuan dan pengembangan obat antibakteri baru, salah satunya dengan memanfaatkan bakteri endofit dari tumbuhan obat (Purwanto *et al.* 2014). Bakteri endofit mampu menghasilkan senyawa bioaktif bersifat antibakteri yang sama dengan tanaman inangnya, maka tidak perlu menebang tanaman aslinya untuk diambil sebagai simplisia, yang kemungkinan besar memerlukan puluhan tahun untuk dapat dipanen (Kusumawati *et al.* 2014; Radji 2005).

Indonesia merupakan negara yang memiliki biodiversitas yang tinggi dan memiliki kawasan hutan hujan tropis yang luas. Banyak spesies tumbuhan hutan yang berpotensi sebagai tumbuhan obat tetapi belum dimanfaatkan secara optimal, salah satu diantaranya adalah nyawai (*Ficus variegata* Blume). Tumbuhan nyawai belum banyak dikenal oleh masyarakat, padahal jenis nyawai sudah lama dimanfaatkan oleh masyarakat sekitar hutan. Getah buah dan air rebusan buah nyawai juga digunakan dalam pengobatan tradisional masyarakat sebagai obat disentri (Dephut 2008).

Rijai (2013) telah melaporkan bahwa buah nyawai merupakan sumber antibakteri yang sangat potensial karena memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri yang berperan penting terhadap terjadinya penyakit pada masyarakat. Aktivitas tersebut berkaitan dengan metabolit sekunder yang terkandung dalam buah nyawai yaitu senyawa alkaloid dan saponin. Daun nyawai diketahui memiliki kandungan fenol yang tinggi (Lushaini *et al.* 2015). Kandungan senyawa tersebut kemungkinan besar memiliki aktivitas antibakteri yang juga dihasilkan oleh bakteri endofit yang hidup di dalam tumbuhan nyawai. Selama ini belum pernah dilaporkan adanya bakteri endofit dari tumbuhan nyawai. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mencakup isolasi dan identifikasi bakteri endofit untuk menggali potensinya dalam menghasilkan senyawa bioaktif berupa senyawa antibakteri.

2. METODOLOGI

Bahan yang digunakan adalah nyawai (*Ficus variegata* Blume) yang diperoleh dari daerah Gunung Sindur, Bogor. Isolat bakteri uji yaitu *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*

berasal dari koleksi Laboratorium Bakteriologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

Isolasi Bakteri Endofit

Sampel berupa akar nafas, batang, daun, dan buah tumbuhan nyawai (*Ficus variegata* Blume). Sampel dicuci dengan air mengalir hingga bersih, kemudian dipotong masing-masing sekitar 1-3 cm. Potongan sampel tersebut dilakukan sterilisasi permukaan secara bertahap. Potongan sampel direndam etanol 96% selama 1 menit, dilanjutkan ke dalam Na-hipoklorit 5.25% selama 5 menit, kemudian dibilas lagi ke dalam etanol 96% sebanyak tiga kali. Sampel yang telah disterilisasi lalu ditanam pada media isolasi *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung nistatin (0.01% b/v) kemudian diinkubasi di ruang gelap dan diamati sampai adanya pertumbuhan koloni. Pemurnian koloni bakteri dilakukan dengan memindahkan 1 ose koloni ke dalam cawan Petri yang berisi media NA. Setelah diperoleh biakan murni, bakteri endofit dipindahkan ke agar miring NA (modifikasi Kusumawati *et al.* 2014).

Penapisan Isolat Bakteri Endofit (Simarmata *et al.* 2007)

Peremajaan isolat bakteri endofit dan bakteri uji (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, dan *P. aeruginosa*) dilakukan dengan menginokulasi bakteri ke dalam media NA lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28-30°C. Koloni bakteri uji yang tumbuh dipindahkan ke dalam 5 ml media *Nutrient Broth* (NB) kemudian diinkubasi pada suhu 28-30°C sampai jumlah sel 10^8 CFU/ml. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menambahkan masing-masing 0,4 ml kultur bakteri uji ke dalam 80 ml media NA, kemudian

dituang ke dalam cawan Petri steril sebanyak 20 ml dan dibiarkan memadat. Isolat bakteri endofit diinokulasikan dengan ose ke dalam media yang telah berisi bakteri uji. Cawan tersebut diinkubasi selama 24-48 jam. Zona hambat diukur berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk di sekitar isolat bakteri endofit. Isolat bakteri endofit yang positif menunjukkan zona hambat terhadap semua patogen merupakan isolat potensial.

Identifikasi Morfologi dan Biokimia Isolat Bakteri Endofit Terpilih

Isolat bakteri endofit yang menghasilkan zona hambat terluas kemudian diidentifikasi secara morfologi dan uji biokimia bakteri. Uji biokimia tersebut meliputi uji katalase, uji oksidase, motilitas, pigmen, pertumbuhan, uji gula-gula, hidrolisis gelatin, hidrolisis kasein, urea, sitrat, dan arginin. Hasil dari karakterisasi bakteri tersebut kemudian dikocokkan dengan *Manual for the identification of Medical Bacteria* (Cowan 1974).

Identifikasi molekuler 16S rRNA dan Analisis Filogenetik

Ekstraksi DNA bakteri endofit potensial dilakukan dengan sentrifugasi koloni isolat potensial yang telah disuspensikan ke dalam larutan garam steril. Pelet diresuspensi dengan penambahan 0.5 mL *InstaGene Matrix* (Bio-Rad, USA). Setelah itu, diinkubasi pada suhu 56°C selama 30 menit, lalu dipanaskan 100°C selama 10 menit. Supernatan yang berisi DNA cetakan siap digunakan untuk proses amplifikasi. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin *Polimerase Chain Reaction* (PCR). Primer yang digunakan yaitu 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

dan 1492R (5'-GGTTACCTTGTTA CGACTT-3'). Volume DNA cetakan yang ditambahkan adalah 1 µl dari 20 µl total larutan reaksi. Amplifikasi DNA dilakukan sebanyak 35 siklus dengan kondisi denaturasi awal 94°C selama 45 detik, *annealing* 55°C selama 60 detik dan elongasi pada suhu 72°C selama 60 detik. Purifikasi produk PCR menggunakan *Montage PCR Clean up kit* (Milipore). Selanjutnya hasil PCR ditentukan urutan basa DNA (*sequencing*) menggunakan primer 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') dan 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'), serta *Big dye terminator cycle sequencing kit* (Applied BioSystems) kemudian dianalisis menggunakan *Applied Biosystems model 3730XL automated DNA sequencing system* (Applied BioSystems). Hasil sekuen disejajarkan dengan data *GenBank* menggunakan program BLAST dari situs NCBI. Analisis pohon filogenetik dilakukan menggunakan program *multiple alignment* Clustal X2 dan konstruksi jarak kekerabatan genetik menggunakan program NJ plot (Singh *et al.* 2011).

Ekstraksi dan Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Isolat Bakteri Endofit Potensial

Isolat bakteri endofit potensial diinkubasi dalam 50 ml media NB dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 28-30°C selama 48 jam. Hasil fermentasi disentrifugasi pada kecepatan 3600 rpm selama 10 menit. Supernatan yang telah terpisah dipindahkan ke corong pemisah dan diekstraksi menggunakan etil asetat (1:1 v/v). Ekstrak yang diperoleh selanjutnya diuapkan pada *vacuum evaporator* pada suhu 40°C (Garcia *et al.* 2012). Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan

metode difusi sumur dengan mengukur diameter penghambatan dari ekstrak tersebut. Media NA yang mengandung bakteri uji dengan jumlah sel 10⁸ CFU/ml dituangkan ke dalam cawan Petri steril dan dibiarkan memadat. Selanjutnya media tersebut dibuat lubang-lubang atau sumur dengan diameter 6 mm. Ekstrak senyawa antibakteri sebanyak 50 µl dimasukkan ke dalam lubang tersebut dan diinkubasi dalam inkubator suhu 37°C selama 24-48 jam (Garriga *et al.* 1993). Kloramfenikol 60 µg/ml digunakan sebagai kontrol positif dan pelarut etil asetat digunakan sebagai kontrol negatif.

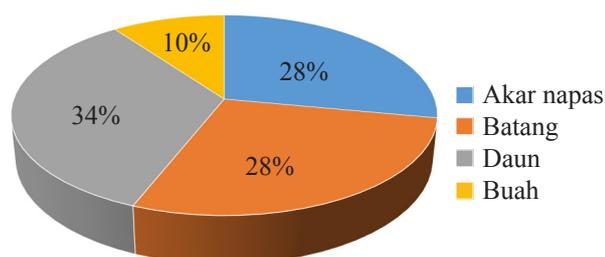
Identifikasi Senyawa Antibakteri dengan Gas Chromatography – Mass Spectrometer (GC-MS)

Analisis dengan GC-MS dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa antibakteri dalam ekstrak etil asetat menggunakan kolom kapiler tipe Phase Rtx-5MS dengan panjang 60 m dan diameter 0.25 mm. Kondisi alat GC-MS yaitu suhu kolom 50°C, gas pembawa helium, suhu SPL 280°C, suhu *MS Interface* 280°C, suhu pirolisis 280°C, dan suhu permukaan ion 200°C.

3. HASIL

Isolat Bakteri Endofit

Sebanyak 29 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari beberapa bagian tumbuhan nyawai. Bagian daun (DN) memiliki jumlah isolat bakteri endofit terbanyak yaitu sebanyak 10 isolat, kemudian diikuti akar napas (AR) dan batang (BT) masing-masing sebanyak 8 isolat, dan terakhir adalah bagian buah (BH) sebanyak 3 isolat dengan sebaran seperti pada Gambar 1.



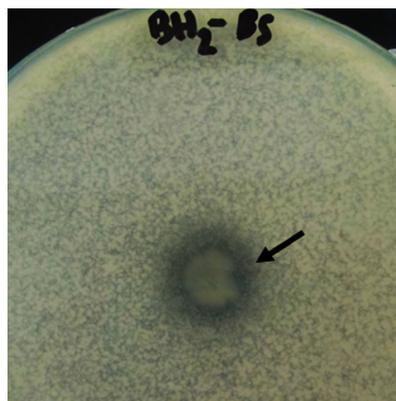
Gambar 1 Presentase bakteri endofit yang diisolasi dari tumbuhan nyawai

Aktivitas Antibakteri

Hasil penapisan menunjukkan dari 29 isolat bakteri endofit hanya 7 isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibakteri yaitu isolat DN11, DN12, DN13, DN14, DN15, BT12, dan BH2. Sebanyak 6 isolat mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus*, 5 isolat mampu menghambat *E. coli*, 4 isolat menghambat *B. subtilis*, dan 4 isolat mampu menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa*. Pemilihan isolat potensial dilakukan dengan memilih isolat yang membentuk zona hambat paling besar dan jernih pada semua bakteri uji. Isolat BH2 dipilih sebagai isolat potensial untuk tahap berikutnya karena menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap seluruh bakteri uji yaitu *B. subtilis* (13 mm), *S. aureus* (11 mm), *E. coli* (3 mm), dan *P.aeruginosa* (2 mm). Zona hambat yang terbentuk pada penapisan aktivitas antibakteri isolat BH2 terhadap *B. subtilis* disajikan pada Gambar 2.

Morfologi dan Biokimia Bakteri Endofit Terpilih

Hasil pengamatan secara morfologi koloni dan sel (Gambar 3), menunjukkan bahwa isolat BH2 berbentuk batang dan termasuk bakteri Gram negatif. Hasil identifikasi morfologi dan uji biokimia isolat BH2 selanjutnya dibandingkan dengan ciri-ciri bakteri yang di-



Gambar 2 Zona hambat yang terbentuk pada aktivitas antibakteri isolat BH2 terhadap *B. subtilis*

uraikan oleh Cowan (1974). Berdasarkan karakter morfologi dan biokimia yang diperoleh, bakteri ini memiliki kemiripan dengan jenis *Pseudomonas* sp. Hasil identifikasi isolat BH2 secara morfologi dan biokimia dapat dilihat pada Tabel 1.

Identifikasi Molekular 16S rRNA dan Pohon Filogenetik

Berdasarkan *alignment* (pensejajaran) dengan sekuen 16S rRNA isolat BH2, diperoleh pasangan basa sepanjang 1463 bp. Urutan basa yang diperoleh dari hasil sekuensing isolat BH2 selanjutnya dianalisis dengan program BLAST dari *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI). Hasil analisis sekuen 16S rRNA menggunakan program BLAST menunjukkan isolat BH2 memiliki kemiripan dengan *Pseudomonas aeruginosa* strain SV1 dengan homologi 99% dengan kode akses KF322024.1.

Hasil analisis pohon filogenetik dapat dilihat pada Gambar 5. Angka yang terdapat disetiap cabang pohon memperlihatkan nilai *bootstrap*. Berdasarkan pohon filogenetik yang mengikutsertakan beberapa data sekuen

GenBank sebagai pembanding menunjukkan bahwa isolat BH2 berada dalam satu kelompok spesies *Pseudomonas*. Isolat BH2 memiliki kemiripan terdekat dengan *Pseudomonas aeruginosa*. *Bacillus subtilis* strain MRRP129 merupakan bakteri Gram positif yang dijadikan sebagai *out of group* sehingga memiliki cabang yang berbeda.

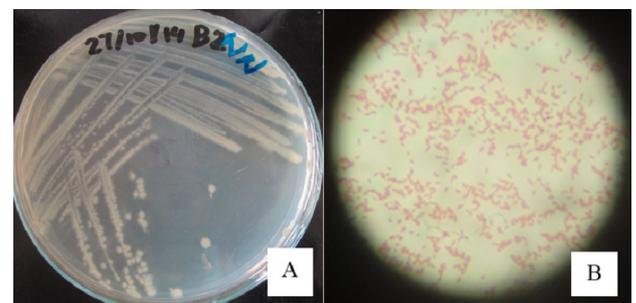
Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Isolat BH2

Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat isolat BH2 memiliki spektrum luas karena mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Ekstrak etil asetat isolat BH2 menunjukkan hambatan terhadap bakteri uji yaitu *B. subtilis* (16.03 mm) *S. aureus* (11.37 mm) *P. aeruginosa* (8.50 mm), dan *E. coli*

(8.73 mm). Berdasarkan hasil tersebut, ekstrak etil asetat isolat BH2 mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji dengan diameter zona hambat yang paling besar yaitu terhadap *B. subtilis* ditunjukkan pada Gambar 5.

Senyawa Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Isolat BH2 dengan GC-MS

Hasil identifikasi senyawa menggunakan GC-

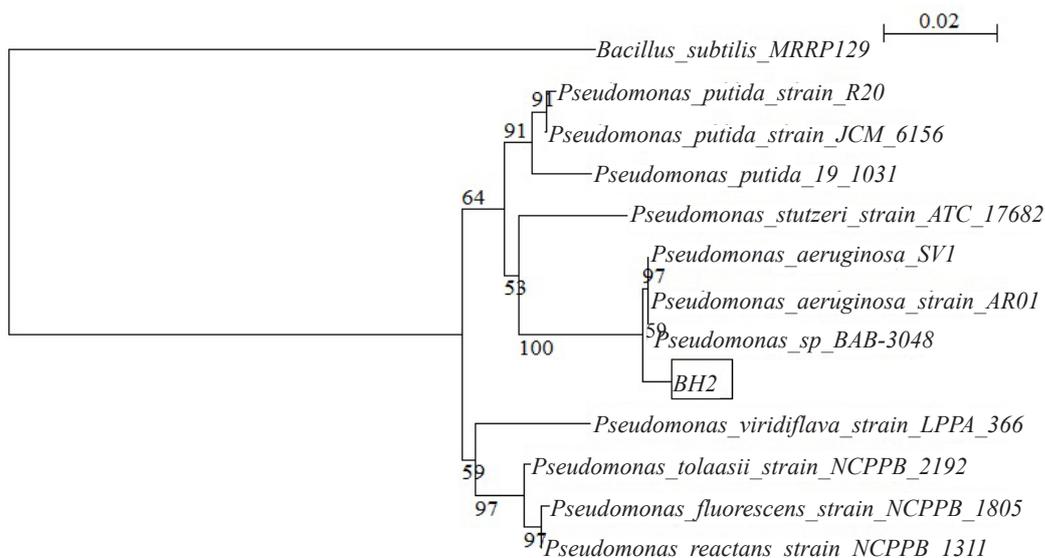


Gambar 3 (A) Morfologi koloni dan (B) Pewarnaan Gram sel bakteri endofit isolat BH2

Tabel 1 Karakter morfologi dan biokimia isolat bakteri BH2

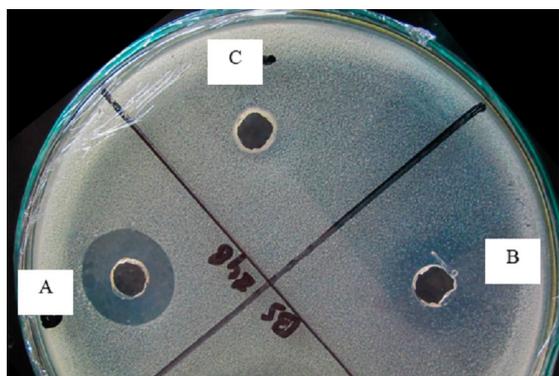
Parameter Uji	Hasil Reaksi					
	Warna	Bentuk	Elevasi	Tepian	Tekstur	
Morfologi koloni	putih krem	bulat	timbul	keriting	licin	
Morfologi sel	Gram negatif	Bentuk batang				
Katalase	+					
Oksidase	+					
Motilitas	+					
Pigmen	+					
Pertumbuhan	42°C -	MacConkey +				
Uji gula-gula	Glukosa +	Laktosa -	Maltosa d	Manitol d	Salicine -	Xylose -
Hidrolisis	Gelatin -	Kasein -				
Urease	d					
Arginin	+					
Citrate	-					

Keterangan : (+) uji positif, (-) uji negatif, dan (d) uji *dubius*



Gambar 4 Pohon filogenetik berdasarkan sekuen gen 16S rRNA dari isolat BH2

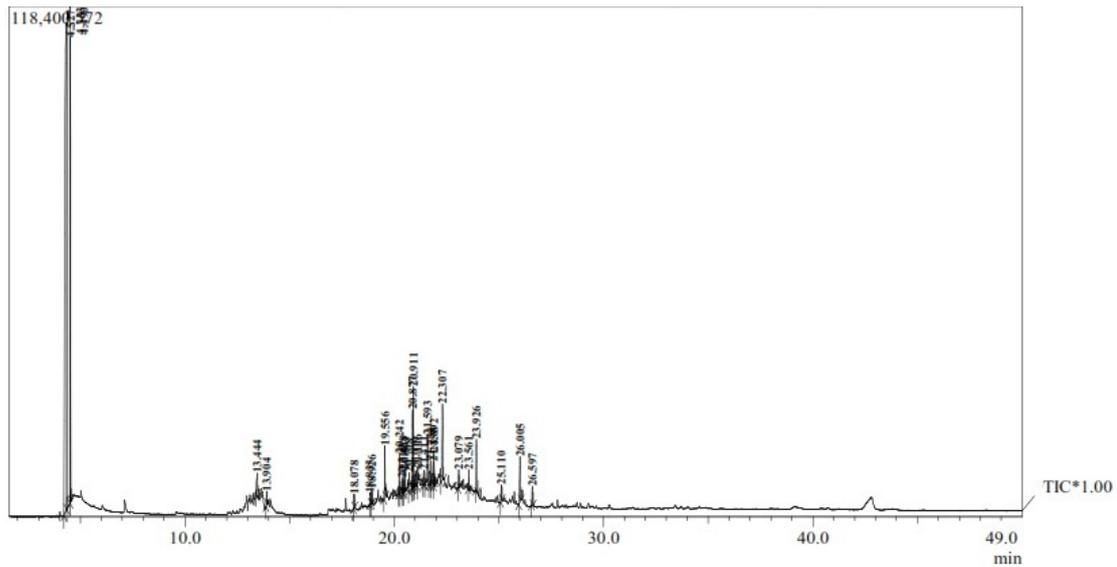
MS terhadap ekstrak etil asetat isolat BH2 dihasilkan sebanyak 30 senyawa berdasarkan penelusuran *database* yang terdapat dalam perangkat komputer GC-MS (Gambar 6). Senyawa dengan konsentrasi tertinggi adalah *Nonanoic acid ethyl ester* (CAS) dengan konsentrasi 42.00% dan beberapa senyawa lain dengan konsentrasi kecil yang diduga sebagai senyawa antibakteri (Tabel 2).



Gambar 5 Zona hambat yang terbentuk pada pengujian ekstrak etil asetat isolat BH2 terhadap *B. subtilis*. (A) Ekstrak etil asetat isolat BH2, (B) kontrol positif kloramfenikol 60µg/mL, dan (C) kontrol negatif pelarut etil asetat

4. PEMBAHASAN

Bakteri endofit diisolasi dari tumbuhan nyawai melalui sterilisasi permukaan. Hallman *et al* (1997) mendefinisikan bakteri endofit adalah bakteri yang hidup dalam jaringan tanaman yang dapat diisolasi melalui sterilisasi permukaan jaringan. Bakteri endofit pada penelitian ini berhasil diisolasi dari jaringan tumbuhan nyawai seperti akar napas, batang, daun, dan buah (Gambar 1). Purwanto *et al.* (2014) menyatakan bahwa jalur masuk bakteri endofit umumnya melalui akar serta bagian tanaman yang terpapar udara langsung seperti bunga, daun (melalui stomata), dan kotiledon. Jumlah bakteri endofit tumbuhan nyawai lebih banyak terdapat pada bagian daun. Hal ini berbeda dengan Kusumawati *et al.* (2014) yang memperoleh bakteri endofit paling banyak pada bagian batang tanaman miana. Sedangkan Zinniel *et al.* (2002) menyatakan jumlah bakteri endofit banyak terdapat di akar dan sedikit pada daun dan batang. Adanya variasi jumlah bakteri endofit tersebut tergantung dari jenis



Gambar 6 Kromatogram GC-MS ekstrak etil asetat isolat BH2

tanaman, umur tanaman, struktur tanah, sebaran geografis, dan waktu pengambilan sampel (Seo *et al.* 2010).

Penapisan merupakan tahap seleksi dan penentuan bakteri endofit tumbuhan nyawai yang memiliki aktivitas antibakteri. Isolat bakteri endofit yang memiliki aktivitas antibakteri dapat dilihat dari zona hambat yang terbentuk. Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri, isolat

DN11, DN12, DN13, DN14, DN15, BT12, dan BH2 mampu menghasilkan zona hambat. Isolat BH2 yang berhasil diisolasi dari buah nyawai menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap semua bakteri uji. Zona hambat yang terbentuk disebabkan adanya senyawa metabolit sekunder bakteri endofit yang memiliki aktivitas antibakteri (Kusumawati *et al.* 2014) dan perbedaan antara dinding sel bakteri uji

Tabel 2 Jenis senyawa dalam ekstrak etil asetat isolat BH2

Puncak	Kelimpahan (%)	Waktu Retensi (menit)	Berat Molekul (g/mol)	Rumus Molekul	Nama Senyawa
2	42.00	4.490	186	$C_{11}H_{22}O_2$	<i>Nonanoic acid ethyl ester</i>
6	0.22	18.078	198	$C_{14}H_{30}$	<i>Tetradecane</i>
9	0.86	19.556	254	$C_{18}H_{38}$	<i>Octadecane</i>
13	0.40	20.501	382	$C_{25}H_{50}O_2$	<i>Tetracosanoic acid, methyl ester</i>
15	1.58	20.877	256	$C_{16}H_{32}O_2$	<i>Hexadecanoic acid</i>
16	1.81	20.911	282	$C_{20}H_{42}$	<i>Eicosane</i>
21	0.82	21.733	296	$C_{19}H_{36}O_2$	<i>9-Octadecenoic acid (Z),-methyl ester</i>
23	0.59	21.892	408	$C_{29}H_{60}$	<i>Nonacosane</i>
24	1.84	22.307	310	$C_{22}H_{46}$	<i>Docosane</i>
27	1.25	23.926	422	$C_{30}H_{62}$	<i>Triacontane</i>
29	1.17	26.005	390	$C_{24}H_{38}O_4$	<i>1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis (2-ethylhexyl) ester</i>

(Tortora *et al.* 2007). Berdasarkan hasil tersebut maka isolat BH2 merupakan isolat potensial dan dipilih untuk tahap berikutnya.

Identifikasi bakteri endofit dilakukan berdasarkan pengamatan morfologi dan aktivitas biokimianya. Identifikasi bakteri secara konvensional ini diperlukan untuk penentuan jenis dalam taksonomi. Hasil pengamatan ciri-ciri morfologi dan uji biokimia kemudian dibandingkan dengan ciri-ciri bakteri yang diuraikan oleh Cowan (1974). Berdasarkan hasil pengamatan morfologi sel (Gambar 3), menunjukkan bahwa isolat BH2 termasuk bakteri Gram negatif dan berbentuk batang. Isolat BH2 juga memiliki aktivitas enzim katalase yang merupakan enzim yang penting bagi sel bakteri dan biasanya terdapat pada sel-sel bakteri dengan metabolisme aerobik (Wilson 2014).

Hasil identifikasi isolat BH2 yaitu memiliki kemiripan dengan *Pseudomonas* sp. Genus *Pseudomonas* merupakan bakteri endofit yang banyak ditemukan hampir pada semua sampel tanaman. Hal ini dikarenakan bakteri ini mudah ditumbuhkan dan berpotensi sebagai agen biokontrol (Miller *et al.* 2012). *Pseudomonas* dikenal sebagai bakteri antagonis karena menghasilkan metabolit sekunder berupa antibiotik terhadap bakteri patogen tumbuhan. Bakteri endofit *Pseudomonas* yang berhasil diisolasi dari tanaman mangrove memiliki aktivitas antibakteri dan antifungi (Jose & Christy 2013). Selain itu, Elita *et al.* (2013) melaporkan bakteri endofit genus *Pseudomonas* sp. dari tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*) mengandung metabolit sekunder golongan saponin yang berpotensi sebagai antibakteri karena dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus*.

Identifikasi bakteri melalui pendekatan biokimia dilakukan dengan melihat perilaku bakteri terhadap fermentasi gula maupun melihat aktivitas enzim yang dimilikinya. Saat ini, teknik identifikasi berdasarkan molekuler lebih banyak digunakan sebagai metode tambahan ataupun sebagai pengganti metode biokimia. Metode molekuler menggunakan sekuensing 16S rRNA dapat mempelajari filogenetik dan taksonomi. Analisis sekuen gen 16S rRNA dan analisis filogenetik menunjukkan bahwa isolat BH2 memiliki kemiripan terdekat dengan *Pseudomonas aeruginosa* strain SV1 (Gambar 4). Hal ini dapat membuktikan bahwa isolat BH2 dapat digolongkan ke dalam spesies *Pseudomonas aeruginosa*. Spesies ini dapat memberikan keuntungan pada tumbuhan inangnya. Berdasarkan hasil penelitian Hidayati (2014) membuktikan bahwa bakteri endofit *Pseudomonas aeruginosa* yang diisolasi dari tanaman karet mampu menghasilkan hormon *Indole Acetic Acid* (IAA), Gliberelin dan Sitokinin. Selain itu, Charyulu *et al.* (2012) menunjukkan bahwa ekstrak metabolit sekunder *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 5210 yang diisolasi dari sedimen laut mampu menghasilkan senyawa antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba resisten terhadap antibiotik seperti *Methicillin Resisten Staphylococcus aureus* (MRSA).

Pengujian aktivitas ini dilakukan untuk mengetahui potensi antibakteri dari ekstrak etil asetat isolat BH2 dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Zona hambat yang terbentuk disebabkan adanya senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antibakteri. Kontrol positif yang digunakan adalah kloramfenikol karena merupakan antibiotik berspektrum luas yang aktif terhadap bakteri Gram positif maupun

Gram negatif. Pelarut etil asetat yang diujikan sebagai kontrol negatif terhadap keempat bakteri uji tidak menunjukkan aktivitas zona hambat. Hal ini membuktikan bahwa diameter zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak etil asetat disebabkan oleh adanya senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri dan bukan pengaruh dari pelarut etil asetat (Sugara 2011).

Ekstrak etil asetat isolat BH2 memiliki spektrum luas karena mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Ekstrak etil asetat isolat BH2 menghasilkan diameter zona hambat yang cenderung lebih besar terhadap *B. subtilis* dibandingkan dengan diameter zona hambat pada bakteri uji lainnya. Charyulu *et al.* (2012) melaporkan aktivitas antibakteri metabolit sekunder *P. aeruginosa* menunjukkan aktivitas bakterisidal terhadap *B. subtilis* dan *S. aureus*. Hasil penelitian ini juga membuktikan bahwa isolat BH2 yang diisolasi dari buah nyawai dan memiliki kemiripan dengan *P. aeruginosa* strain SV1 ini memiliki aktivitas antibakteri seperti pada ekstrak tumbuhan inangnya. Rijai (2013) membuktikan bahwa zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak etil asetat buah nyawai memiliki aktivitas antibakteri dengan diameter zona hambat terbesar terhadap *B. subtilis* dibandingkan *S. aureus*, *E. coli* dan *P. aeruginosa*.

Bakteri endofit memiliki kemampuan mensintesis senyawa metabolit sekunder yang termasuk ke dalam kelompok senyawa bioaktif (Baker & Satish 2013). Adanya aktivitas antibakteri dari ekstrak etil asetat isolat BH2 terhadap bakteri uji mengindikasikan keberadaan suatu senyawa antibakteri yang terdapat dalam ekstrak tersebut. Berdasarkan senyawa-senyawa yang teridentifikasi pada

analisis GC-MS, ekstrak etil asetat isolat BH2 menunjukkan beberapa senyawa yang berpotensi sebagai senyawa antibakteri dapat ditunjukkan pada Tabel 2. Senyawa-senyawa tersebut sebagian besar merupakan senyawa asam lemak. Beberapa jenis asam lemak telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri. Asam lemak memiliki atom karbon lebih dari sepuluh yang dapat merusak permeabilitas membran sitoplasma yang kemudian mengalami lisis dan mengakibatkan kematian pada bakteri patogen (Naviner *et al.* 1999).

Nonanoic acid merupakan senyawa yang memiliki nilai kelimpahan terbanyak yaitu 42%. *Nonanoic acid* atau *pelargonic acid* merupakan unsur utama dari minyak atsiri nonanal. Minyak atsiri dikenal memiliki aktivitas antimikroba. Turunan *Nonanoic acid* telah dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba yaitu mampu menghambat pertumbuhan *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium smegmatis*, *Sarcina lutea*, dan *Candida utilis* (Sahin *et al.* 2006).

Berdasarkan hasil analisis GC-MS didapatkan juga senyawa-senyawa lainnya dengan konsentrasi kecil. Senyawa *Hexadecanoic acid* dan *9-Octadecenoic acid* merupakan turunan dari asam palmitat yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri. Sugara (2011) melaporkan bahwa ekstrak etil asetat tanaman obat bandotan memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan komponen yang terkandung di dalamnya yaitu senyawa *Hexadecanoic acid* dan *9-Octadecenoic acid*. Fitriani *et al.* (2015) juga menyatakan ekstrak kasar bakteri endofit *Pseudomonas* yang diisolasi dari akar *Ageratum conyzoides* L. mengandung senyawa *9-Octadecenoic acid*.

Senyawa *Tetracosanoic acid methyl ester* yang terkandung di dalam ekstrak daun *Finlaysonia obovata* memiliki aktivitas antibakteri dengan menghambat pertumbuhan bakteri patogen ikan yaitu *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio alginoliticus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Edwardsiella tarda* dan *Micrococcus sp.* (Mishra & Sree 2007). Senyawa 1,2-*Benzenedicarboxylic acid bis (2-ethylhexyl) ester* ditemukan pada kapang endofit *Taxus yunnanensis* yang mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *B. subtilis* (Chen *et al.* 2009). Penelitian yang dilakukan oleh Gohar *et al.* (2010) menginformasikan keberadaan senyawa 1,2-*Benzenedicarboxylic acid bis (2-ethylhexyl) ester* pada ekstrak etil asetat metabolit sekunder *Burkholderia cepacia* yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* dan *Vibrio ordalli*. Selain itu, beberapa senyawa yang diperoleh dari ekstrak heksana daun *Azadirachta indica* seperti *tetradecane*, *octadecane*, *eicosane*, *nonacosane*, *docosane* dan *triacontane* merupakan senyawa yang juga memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* (Akpuaka *et al.* 2013).

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa bakteri endofit dapat diisolasi dari tumbuhan nyawai (*Ficus variegata* Blume) yaitu sebanyak 29 isolat. Isolat BH2 merupakan isolat bakteri endofit potensial yang mampu menghambat pertumbuhan keempat jenis bakteri uji. Hasil identifikasi secara morfologi dan biokimia, menunjukkan isolat BH2 memiliki kemiripan dengan *Pseudomonas sp.* Berdasarkan analisis sekuen 16S rRNA, isolat BH2 memiliki presentase kemiripan dengan *Pseudomonas aeruginosa* strain SV1 sebesar 99%. Hasil GC-MS ekstrak etil asetat isolate

BH2 menunjukkan bahwa terdapat senyawa aktif yang diduga berperan sebagai antibakteri yaitu *nonanoic acid ethyl ester*.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada analis dan staf Laboratorium Bakteriologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor yang telah memberikan bantuan dan arahan selama penelitian

6. DAFTAR PUSTAKA

- Akpuaka A, Ekwenchi EK, Dashak DA, Dildar A. 2013. Biological activities of characterized isolate of n-hexane extract of *Azadirachta Indica* A.Juss (Neem) leaves. *New York Science Journal*. 6(6): 119-124.
- Baker S, Satish S. 2013. Bioprospecting of endophytic bacterial plethora from medicinal plant. *Plant Sciences Feed*. 3:42-45.
- Charyulu EM, Japyesan S, Gnanamani A. 2012. Antioxidant and antimicrobial profile of a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*: ESR and spectrophotometric methods. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*. 1(2): 119-126.
- Chen S, Liu J, Gong H, Yang D. 2009. Identification and antibacterial activity of secondary metabolites from *Taxus* endophytic fungus. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 25: 368-374.
- Cowan SJ. 1974. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press.
- [Dephut] Departemen Kehutanan. 2008. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Tahun Anggaran 2008 Satuan Kerja Pusat Informasi Kehutanan tentang Nyawai (*Ficus variegata* Blume). Jakarta: Dephut.
- Elita A, Saryono S, Cristine J. 2013. Penentuan waktu optimum produksi antimikroba dan uji fitokimia ekstrak kasar fermentasi bakteri endofit *Pseudomonas sp.* dari tanaman dahlia

- (*Dahlia variabilis*). *Journal Indonesian Chemica Acta*. 3(2):56-62.
- Fitriani A, Fajrul I, Yanti H, Maemunah. 2015. Antibacteria activity of *Shewanella* and *Pseudomonas* as endophytic bacteria from the root of *Ageratum conyzoides* L. *Asian Journal of Applied Sciences*. 3: 415-420.
- Garcia A, Rhoden SA, Bernardi WJ, Orlandelli RC, Azevedo JL, Pamphile JA. 2012. Antimicrobial activity of crude extract of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2(10):35-40.
- Garriga M, Aymerich HM, Monfort JM. 1993. Bacteriocinogenic activity of *Lactobacilli* from fermentor sausages. *Journal of Applied Bacteriology*. 75:142-148.
- Gohar YM, El-Naggar MMA, Soliman MK, Barakat KM. 2010. Characterization of marine *Burkholderia cepacia* antibacterial agents. *International Journal of Natural Products*. 3: 86-94.
- Hallman J, Hallmann AQ, Mahaffee WF, Kloepper JW. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 43: 895-914.
- Hidayati U. 2014. Potensi bakteri endofit asal tanaman karet sebagai pemacu pertumbuhan bibit batang bawah tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.). [Disertasi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Jose AC, Christy PH. 2013. Assessment of antimicrobial potential of endophytic bacteria isolated from *Rhizophora mucronata*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2(10):188-194.
- Kusumawati DE, Fachriyan HP, Maria B. 2014. Aktivitas antibakteri isolate bakteri endofit dari tanaman miana (*Coleus scutellarioides* L. Benth.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Journal Current Biochemistry*. 1(1): 45-50.
- Lushaini S, Muhamad AW, Puji A. 2015. Kandungan total fenol, aktivitas antioksidan dan sitotoksik daun kedadai (*Ficus variegata* Blume). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 4(2): 1-5.
- Miller KI, Qing C, Sze DM, Roufogalis BD, Neilan BA. 2012. Culturable endophytes of medicinal plants and the genetic basis for their bioactivity. *Microbial Ecology*. 64: 431-449.
- Mishra PM, Sree A. 2007. Antibacterial activity and GCMS analysis of the extract of leaves of *Finlaysonia obovate* (A Mangrove Plant). *Asian Journal of Plant Sciences*. 6(1): 168-172.
- Naviner M, Bergee JP, Durand P, Le BH. 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Journal aquacultur*. 174: 15-24.
- Purwanto UMS, Fachriyan HP, Maria B. 2014. Isolasi Bakteri endofit dari tanaman sirih hijau (*Piper betle* L.) dan potensinya sebagai penghasil senyawa antibakteri. *Journal Current Biochemistry*. 1(1): 51-57.
- Radji M. 2005. Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 3: 113-126.
- Rijai, L. 2013. Potensi tumbuhan libo (*Ficus variegata* Blume) sebagai sumber bahan farmasi potensial. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*. 2(3): 166-179.
- Sahin N, Ibrahim K, Yunus E. 2006. Investigation of antimicrobial activities of nonanoic acid derivatives. *Fresenius Environmental Bulletin*. 15(2): 141-143.
- Seo WT, Lim WJ, Kim EJ, Yun HD, Lee YH, Cho KM. 2010. Endophytic bacterial diversity in the Young Radish and their antimicrobial activity against pathogens. *Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 53(4): 493-503.
- Simarmata R, Lekatompessy S, Sukiman H. 2007. Isolasi mikroba endofitik dari tanaman obat sambung nyawa (*Gynura procumbens*) dan analisis potensinya sebagai antimikroba. *Berkala Penelitian Hayati*. 13: 85-90.

- Singh V, Chaudhary DK, Mani I. 2011. Molecular characterization and modeling of secondary structure of 16S rRNA from *Aeromonas veronii*. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 3 (1): 253-260.
- Sugara TH. 2011. Karakterisasi senyawa aktif antibakteri dari fraksi etil asetat daun tanaman bandotan (*Ageratum conyzoides* L). [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2007. *Microbiology: An Introduction 9th edition*. San Francisco: Pearson Education.
- Wilson W. 2014. Bakteri endofit tanaman purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) berdasarkan karakter morfologis, biokimia, dan molecular. [Tesis]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Zinniel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng Z, Kuczmarski D, Higley P, Ishimaru CA, Arunakumari A, Barletta RG, Vidaver AK. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(5): 2198-2208.