



## Isolation and identification with 16s rRNA gene of endophytic bacteria from papaya (*Carica papaya* L.) and test of its antibacterial activity

### Isolasi dan identifikasi dengan gen 16s rRNA bakteri endofit dari tanaman pepaya (*Carica papaya* L.) serta uji aktivitas antibakterinya

**Irwandi<sup>1)</sup>, Lola Azyenela, Hera Purnama Sari, Epi Supri Wardi, Diza Sartika**

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi Universitas Perintis Indonesia Padang, Sumatera Barat, Indonesia.

e-mail author: [irwandi.apt@gmail.com](mailto:irwandi.apt@gmail.com)

#### ABSTRACT

Endophytic bacteria live symbiotically in host plant tissues and can produce the same bioactive compounds as their host plants, including antibacterial agents. This study aimed to isolate and test the antibacterial activity of endophytic bacteria from the *Carica papaya* plant and to carry out molecular identification using the 16S rRNA gene against bacterial isolates with the most excellent antibacterial activity. A total of six isolates of endophytic bacteria were successfully separated through the purification process. Through microscopic identification using gram staining, all endophytic bacterial isolates belong to gram-positive bacteria. The results of the antibacterial activity test showed that the six isolates of papaya plant endophytic bacteria could cause the growth of *Escherichia coli* bacteria but not against *Staphylococcus aureus* bacteria. The average diameter of the inhibition zone against *Escherichia coli* bacteria is as follows: RB1: 9.35 mm; RB2: 9.4mm; RB3: 9.15mm; CB1: 9.1mm; CB2: 9.2mm; CB3: 8.8mm; FB1: 8.45mm; FB2: 8.75mm; and FB3: 8.6mm. All papaya plant endophytic bacterial isolates had an inhibition zone categorized as weak. Bacterial isolate RB2, which has the most excellent antibacterial activity, is identified molecularly as *Bacillus cereus*.

**Keywords:** Endophyte bacteria; *Carica papaya*; antibacterial; identification molecular; gen 16s r RNA

#### ABSTRAK

Bakteri endofit adalah jenis bakteri yang hidup secara simbiosis di dalam jaringan tanaman inang dan memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa bioaktif yang sama dengan tanaman inangnya, termasuk sebagai agen antibakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan menguji aktivitas antibakteri dari bakteri endofit yang berasal dari tanaman *Carica papaya*, serta melakukan identifikasi molekuler menggunakan gen 16S rRNA terhadap isolat bakteri dengan aktivitas antibakteri terbesar. Sebanyak enam isolat bakteri endofit berhasil dipisahkan melalui proses penyucian. Melalui identifikasi mikroskopis menggunakan pewarnaan gram, semua isolat bakteri endofit tersebut tergolong dalam bakteri gram positif. Hasil pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa keenam isolat bakteri endofit tanaman pepaya memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, namun tidak terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Diameter rata-rata zona hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* adalah sebagai berikut: RB1: 9,35 mm; RB2: 9,4 mm; RB3: 9,15 mm; CB1: 9,1 mm; CB2: 9,2 mm; CB3: 8,8 mm; FB1: 8,45 mm; FB2: 8,75 mm; dan FB3: 8,6 mm. Semua isolat bakteri endofit tanaman pepaya memiliki zona hambat yang dikategorikan sebagai lemah. Isolat bakteri RB2, yang memiliki aktivitas antibakteri terbesar, teridentifikasi secara molekuler sebagai *Bacillus cereus*.

**Kata Kunci:** Bakteri endofit; *Carica papaya*; antibakteri; identifikasi molekuler; gen 16s r RNA

## PENDAHULUAN

Penggunaan antibiotik telah mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya jumlah kasus penyakit, terutama infeksi. Namun, sebagian besar antibiotik yang digunakan saat ini adalah jenis antibiotik buatan manusia yang rentan terhadap perkembangan resistensi patogen, terutama bakteri (WHO, 2015). Oleh karena itu, diperlukan upaya eksplorasi untuk menemukan sumber antibiotik alami yang baru. Salah satu metode yang digunakan adalah dengan memanfaatkan bakteri endofit yang hidup secara simbiosis di dalam jaringan tanaman. Bakteri endofit adalah mikroorganisme yang hidup secara simbiosis di dalam jaringan tanaman inang dan dapat bertahan di dalamnya sepanjang atau sebagian siklus hidupnya tanpa menyebabkan kerusakan atau penyakit pada tanaman tersebut (Chebotar et al., 2015).

Bakteri endofit memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa bioaktif dengan sifat antibakteri yang sama dengan tanaman yang menjadi inangnya. Oleh karena itu, tidak perlu merusak tanaman asli tersebut untuk mendapatkan bahan mentahnya, yang mungkin membutuhkan waktu bertahun-tahun untuk bisa dipanen. Proses untuk mendapatkan senyawa aktif dari tanaman juga lebih rumit dan memakan waktu lebih lama dibandingkan dengan mengekstraksi senyawa dari bakteri endofitnya (Kusumawati et al., 2014). Salah satu contoh tanaman obat yang dapat menjadi sumber bakteri endofit adalah pepaya (*Carica papaya* L.). Menurut Ruby (2011), bakteri endofit dapat ditemukan hampir di semua bagian tanaman inang, termasuk akar, batang, daun, biji, buah, umbi, dan juga dalam nodul tanaman legum.

Terdapat banyak penelitian yang telah dilakukan untuk menginvestigasi penggunaan ekstrak tanaman pepaya, dan hasil-hasil penelitian tersebut memberikan bukti bahwa ekstrak tanaman

pepaya memiliki sifat antibakteri, antijamur, dan memiliki potensi sebagai imunostimulan. Senyawa-senyawa seperti terpenoid, karpain, dan flavonoid yang terdapat dalam biji pepaya telah menjadi fokus penelitian dan telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri. Mekanisme kerja senyawa-senyawa ini terkait dengan kemampuannya dalam merusak integritas membran sel bakteri, sehingga mengakibatkan penghancuran bakteri (Martiasih et al., 2012).

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan pencarian bakteri endofit yang melimpah pada tanaman dengan tujuan untuk memperluas atau memperkaya koleksi mikroba. Setelah itu, mikroba yang ditemukan perlu diidentifikasi untuk menentukan sifat pertumbuhan dan jenisnya, agar dapat dimanfaatkan lebih lanjut dalam bidang kesehatan (Noverita et al., 2009). Dalam perkembangan identifikasi mikroorganisme, metode berbasis molekuler telah digunakan saat ini, di antaranya menggunakan gen 16S rRNA untuk identifikasi bakteri (Clarridge, 2004). Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan evaluasi terhadap aktivitas antibakteri dari bakteri endofit yang diisolasi dari akar, batang, dan daun tanaman *Carica papaya*. Untuk menentukan jenis bakteri endofit yang memiliki aktivitas antibakteri paling kuat, dilakukan analisis molekuler dengan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada gen 16S rRNA. Dengan demikian, dapat diidentifikasi tingkat spesies dari bakteri endofit yang terdapat dalam tanaman pepaya.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Lokasi dan periode penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi STIFI Yayasan Perintis Padang dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, pada bulan September 2019 sampai Juni 2020.

## Alat

Dalam penelitian ini, digunakan masker (merek Sensi) dan sarung tangan (merek Sensi) untuk keperluan kebersihan dan keamanan. Alat-alat laboratorium yang digunakan meliputi Erlenmeyer (merek Pyrex), gelas ukur (merek Iwaki), tabung reaksi (merek Iwaki), tabung reaksi, pipet tetes, timbangan analitik dengan merek ADAM, lumpang dan alu, pisau, cawan petri, jarum ose, pinset, bunsen burner, lemari pendingin dengan merek LG, laminar air flow, autoklaf, mikrotube, PCR tube, vortek dengan merek IKA, mikropipet dengan merek Joanlab, tip, jangka sorong, kertas label, plastik wrap, aluminium foil, tisu, kapas, kasa, mikroskop cahaya, kacaobjek, serta seperangkat alat PCR (TE Thermo Cycler) dan seperangkat alat elektroforesis.

## Bahan

Dalam penelitian ini, digunakan sampel akar, batang, dan daun dari tanaman pepaya, serta bakteri uji *Escherichia coli* dan bakteri *Staphylococcus aureus*. Bahan-bahan lain yang digunakan meliputi aquades, etanol 70% (PT. Brataco), etanol 95% (Brataco), NaCl 0,9% (Wida), 1% sodium hypochlorite (NaOCl), nistatin, media Nutrient Agar, media Nutrient Broth, antibiotik amoksisilin dengan konsentrasi 0,1 mg/mL, kristal violet, lugol, larutan safranin, kit isolasi DNA bakteri, primer set (untuk bakteri), Master Mix (Genaxxon bioscience) untuk amplifikasi DNA, gel agarosa, TBE buffer 0,5x, dan etidium bromida.

## Prosedur Kerja Penelitian

### Proses pengambilan dan identifikasi sampel

Sampel-sampel tanaman pepaya (termasuk akar, batang, dan daun) dikumpulkan dari daerah Lubuk Minturun, kecamatan Koto Tangah, Kota Padang, Sumatra Barat. Setelah itu, sampel-sampel tersebut diidentifikasi di Herbarium Fakultas MIPA Universitas Andalas.

### Proses isolasi dan purifikasi bakteri endofit dari tanaman pepaya

Potongan sampel (akar, batang, dan daun) dicuci dan dipotong menjadi ukuran sekitar 1-3 cm. Untuk sterilisasi permukaan, potongan sampel tersebut direndam dalam etanol 96% selama 1 menit, kemudian dalam larutan Na-hipoklorit 5.25% selama 5 menit. Setelah itu, sampel dibilas menggunakan etanol 96% sebanyak tiga kali.

Sampel yang telah disterilisasi kemudian ditanam pada media isolasi Nutrient Agar (NA) yang mengandung nistatin (0.01% b/v). Selanjutnya, sampel ditempatkan dalam ruang gelap dan diamati hingga terjadi pertumbuhan koloni. Untuk memurnikan koloni bakteri, satu koloni dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisi media NA. Setelah berhasil memperoleh biakan isolat murni, bakteri endofit hasil isolasi diinokulasikan pada media agar NA miring (Kusumawati et al., 2014).

### Proses penapisan isolat bakteri endofit

Untuk melakukan peremajaan isolat bakteri endofit dan bakteri uji, termasuk *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, dan *P. aeruginosa*, dilakukan inokulasi bakteri ke dalam media Nutrient Agar (NA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28-30°C. Setelah itu, koloni bakteri uji yang tumbuh dipindahkan ke dalam 5 ml media Nutrient Broth (NB) dan diinkubasi pada suhu 28-30°C hingga mencapai jumlah sel sekitar 10<sup>8</sup> CFU/ml. Selanjutnya, dilakukan uji aktivitas antibakteri dengan menambahkan 0,4 ml kultur bakteri uji ke dalam 80 ml media NA. Campuran ini kemudian dituangkan ke dalam cawan petri steril sebanyak 20 ml dan dibiarkan agar mengeras. Isolat bakteri endofit kemudian diinokulasi ke dalam media yang telah tercampur dengan bakteri uji tersebut. Cawan petri tersebut kemudian diinkubasi selama sekitar 24 hingga 48 jam (Simarta, 2007).

## Identifikasi Morfologi

### Analisis Morfologi makroskopik

Bentuk koloni (dilihat dari atas) dapat berupa titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa akar, atau serupa kumparan. Permukaan koloni (dilihat dari samping) bisa berupa rata, timbul-datar, melengkung, membukit, atau serupa kawah. Tepi koloni (dilihat dari atas) dapat berupa utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, atau keriting. Sedangkan warna koloni bisa beragam, seperti keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan, atau hampir bening.

### Analisis Morfologi mikroskopik

Untuk melakukan prosedur pewarnaan Gram, bakteri endofit diambil secara aseptis menggunakan jarum ose dan ditempatkan di atas gelas objek yang sudah diisi dengan aquadest. Preparat kemudian difiksasi di atas api bunsen hingga kering, dan ditetesi dengan larutan kristal

ungu, lalu dibiarkan selama 1 menit. Setelah itu, zat kristal ungu dihapus dengan mencuci preparat menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya, preparat ditetesi dengan larutan iodin dan didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Larutan alkohol 96% ditetesi pada preparat hingga warna ungu hilang. Selanjutnya, preparat ditetesi dengan larutan safranin dan didiamkan selama 30 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Terakhir, preparat ditetesi dengan larutan fuksin selama 1-2 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu, preparat siap diamati di bawah mikroskop.

### Uji Aktivitas Antibakteri Isolat

Isolat bakteri endofit diambil menggunakan jarum ose dan kemudian diinokulasikan ke media agar. Setelah itu, media agar dengan isolat bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu antara 27°C hingga 29°C. Untuk uji sensitivitas, suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Escherichia coli*, masing-masing sebanyak 200 µL diambil dan disebar merata di permukaan media Mueller Hinton Agar. Di atas permukaan media tersebut diletakkan kertas cakram yang telah ditetesi suspensi isolat bakteri endofit dari tanaman pepaya, serta disk amoksisilin sebagai kontrol positif. Kemudian, media yang mengandung kertas cakram tersebut ditempatkan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah periode inkubasi 24 jam, dilakukan pengamatan terhadap zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram. Pengukuran diameter zona bening dilakukan menggunakan jangka sorong, dan hasilnya diklasifikasikan sesuai dengan standar *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

### Identifikasi Bakteri Endofit Terpilih Secara Molekuler

Isolasi DNA genomik dari kultur bakteri dilakukan menggunakan Genomic DNA Mini Kit (Geneaid) yang telah dimodifikasi. Amplifikasi dilakukan menggunakan mesin PCR combi block dengan menggunakan primer 16S rRNA (Primer 63f Forward: 5'CCAGCAGCCGCGTAATACG-3', Primer 1387 Reverse: 5'-TCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC 3').

Setelah itu, DNA yang telah diamplifikasi dipisahkan menggunakan elektroforesis pada gel agarosa dengan konsentrasi 1%. Gel tersebut direndam dalam larutan campuran Tris-Borat-EDTA

(TBE) dan etidium bromida, kemudian diamati menggunakan sinar UV pada UV-transiluminator. Untuk melakukan sekuensing gen 16S rRNA, fragmen DNA yang terdeteksi setelah amplifikasi dengan PCR dianalisis menggunakan mesin autosequencing untuk menentukan urutan nukleotida. Hasil sekuensing DNA kemudian dianalisis menggunakan program BLAST melalui situs web NCBI. Analisis ini bertujuan untuk mencari kemiripan urutan nukleotida pada gen 16S rRNA dan mengidentifikasi jenis bakteri endofit dari tanaman pepaya (*Carica papaya*) yang memiliki daya antibakteri terbesar.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi dan Purifikasi Bakteri Endofit dari Tanaman *Carica papaya*

Sampel tanaman pepaya diperoleh dari daerah Lubuk Minturun, kecamatan Koto Tangah, Kota Padang, Sumatra Barat. Kemudian, sampel-sampel tersebut menjalani proses identifikasi di Herbarium Universitas Andalas/ Untuk menghasilkan bakteri endofit, bagian akar, batang, dan daun dari sampel digunakan. Masing-masing sampel dibagi menjadi tiga bagian, yaitu bagian dalam, bagian tengah, dan bagian luar. Sampel yang telah diperoleh kemudian disterilisasi permukaannya untuk menghilangkan kotoran dan mikroorganisme epifit yang melekat pada permukaan sampel, sehingga hanya koloni endofit yang dapat tumbuh pada media isolasi. Sampel yang telah disterilisasi dipotong menjadi potongan sepanjang 3-4 cm, lalu diinkubasi pada media Nutrient Agar yang ditempatkan dalam cawan petri. Media Nutrient Agar dipilih karena mengandung nutrisi organik dan anorganik yang dapat menjadi sumber energi untuk mendukung pertumbuhan bakteri. Cawan petri dengan media kemudian diletakkan secara terbalik dalam inkubator untuk mencegah akumulasi uap air di tutup cawan petri yang dihasilkan dari penguapan media selama proses inkubasi (Kusumawati, 2014).

Dari proses pemurnian, diperoleh total 6 isolat bakteri murni yang diberi kode RB1, RB2, RB3, CB1, CB2, CB3, FB1, FB2, dan FB3. Setiap isolat tersebut dibuat dalam *duplo*, yaitu sebagai *working culture* dan *stock culture* (Noverita et al., 2009). Untuk mengkarakterisasi biakan bakteri endofit, keenam isolat tersebut melalui proses pengamatan secara makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan makroskopik dilakukan pada semua

isolat bakteri untuk mengidentifikasi perbedaan dalam sifat-sifat koloni pada media padat, seperti bentuk, tepi, warna, dan ukuran koloni. Sementara itu, pengamatan mikroskopik dilakukan menggunakan metode pewarnaan gram guna memperoleh pemahaman yang lebih rinci mengenai karakteristik mikroorganisme tersebut.

Semua isolat bakteri endofit yang diwarnai dengan metode pewarnaan gram menunjukkan bentuk yang serupa yaitu berbentuk basil atau batang, isolat ini termasuk dalam kelompok bakteri

gram negatif. Kelompok bakteri gram negatif bagian dinding sel sebagian besar terdiri dari lapisan lemak (lipid). Oleh karena itu, dalam proses pewarnaan gram, adanya lapisan lipid ini dapat menghambat penempelan zat warna utama pada sel bakteri, terutama saat dilakukan pencucian dengan alkohol yang dapat merusak lapisan lipid tersebut. Sebagai akibatnya, kelompok bakteri gram negatif ini akan tampak berwarna merah dalam hasil pewarnaan gram (Waluyo, 2008).

**Tabel 1.** Hasil Karakterisasi makroskopis isolat bakteri endofit tanaman pepaya

Kode isolat	Bentuk	Permukaan	Tepian	Warna
<b>RB1</b>	Bulat	Halus	Utuh	Putih susu
<b>RB2</b>	Bulat	Halus	Utuh	Putih susu
<b>RB3</b>	Bulat	Halus	Utuh	Putih susu
<b>CB1</b>	Besar	Timbul datar	Berombak	Putih Kekuningan
<b>CB2</b>	Sedang	Timbul datar	Berombak	Putih Kekuningan
<b>CB3</b>	Sedang	Timbul datar	Berombak	Putih Kekuningan
<b>FB1</b>	Bulat tak beraturan	Halus	Tidak rata	Putih Kekuningan
<b>FB2</b>	Bulat tak beraturan	Halus	Tidak rata	Putih Kekuningan
<b>FB3</b>	Bulat tak beraturan	Halus	Tidak rata	Putih Kekuningan

**Tabel 2.** Hasil Karakterisasi mikroskopis isolat bakteri endofit tanaman pepaya

Kode isolate	Bentuk	Gram
<b>RB1</b>	Basil	positif
<b>RB2</b>	Basil	positif
<b>RB3</b>	Basil	positif
<b>CB1</b>	Basil	positif
<b>CB2</b>	Basil	positif
<b>CB3</b>	Basil	positif
<b>FB1</b>	Basil	positif
<b>FB2</b>	Basil	positif
<b>FB3</b>	Basil	positif

### Uji aktivitas antibakteri dari setiap isolat

Setiap isolat bakteri endofit dari tanaman pepaya diuji untuk aktivitas antibakterinya terhadap bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan bakteri gram negatif (*Escherichia coli*). Uji dilakukan dengan mengamati zona bening yang terbentuk sebagai representasi kemampuan penghambatan pertumbuhan bakteri uji oleh isolat bakteri endofit dari tanaman *Carica papaya*. Hasil pengujian

menunjukkan bahwa semua isolat bakteri endofit yang berasal dari tanaman pepaya menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*, namun tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Daya hambat isolat bakteri *Carica papaya* diklasifikasikan sebagai lemah berdasarkan kriteria yang ditetapkan oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Klasifikasi ini mengacu pada diameter zona

hambat antibakteri yang dihasilkan oleh isolat tersebut. Dalam klasifikasi ini, respons hambatan dikategorikan sebagai lemah jika diameter zona hambat antibakteri  $\leq 14$  mm, sedang jika diameter zona hambat antibakteri berkisar antara 15-18 mm, dan kuat jika diameter zona hambat antibakteri  $\geq 19$  mm.

Adanya zona hambat menunjukkan bahwa bakteri endofit pada tanaman papaya memiliki sifat antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Keberadaan sifat ini dapat disebabkan oleh adanya zat antibakteri yang serupa antara bakteri endofit dan tanaman inangnya, seperti alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Senyawa-senyawa ini umumnya memiliki potensi sebagai senyawa bioaktif yang memiliki efek terhadap aktivitas biologis (Tan dan Zou, 2001).

Alkaloid memiliki kemampuan mengganggu pembentukan komponen peptidoglikan pada bakteri, mengakibatkan gangguan pada lapisan dinding sel dan menyebabkan kematian bakteri. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk kompleks senyawa dengan protein ekstraseluler yang dapat larut, sehingga merusak membran sel bakteri dan menyebabkan pelepasan senyawa intraseluler. Flavonoid juga dapat menghambat DNA gyrase dan

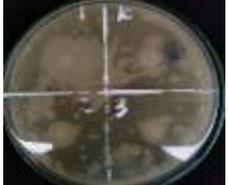
aktivitas enzim ATPase pada bakteri, menghambat pertumbuhan bakteri (Diyani, 2015). Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan menurunkan tegangan permukaan, yang menyebabkan peningkatan permeabilitas atau kebocoran sel dan akhirnya menyebabkan kematian sel. Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah melalui penghambatan enzim *reverse transcriptase* dan DNA *topoisomerase*, yang menghambat pembentukan sel bakteri (Rini, 2017 dan Pratiwi, 2015). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Nirosha (2013), Peter et al. (2014), dan Maria Tuntun (2016) telah menginvestigasi aktivitas antibakteri ekstrak daun papaya terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun papaya memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Bakteri endofit pada tanaman papaya tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Hal ini bisa disebabkan oleh perbedaan struktur dinding sel bakteri, di mana lapisan peptidoglikan pada bakteri gram positif lebih tebal dibandingkan dengan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif juga mengandung asam teikoat yang membuatnya lebih sulit untuk dihancurkan oleh zat aktif atau antibiotik (Sunatmo, 2007).

**Tabel 3.** Uji aktivitas antibakteri dari isolate bakteri endofit *Carica papaya*

Kode isolat	Rata-rata daya hambat bakteri endofit	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
RB1	-	9.35 mm
RB2	-	9.4 mm
RB3	-	9.15 mm
CB1	-	9.1 mm
CB2	-	9.2 mm
CB3	-	8.8 mm
FB1	-	8.45 mm
FB2	-	8.75 mm
FB3	-	8.6 mm
Kontrol	16.65 mm	16.81 mm

**Tabel 4.** Zona Hambat Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri

Daya Hambat	Pengulangan 1	keterangan	Pengulangan 1
<i>Escherichia coli</i>		K= kontrol 1= RB1 2= RB2 3= RB3	
<i>Staphylococcus aureus</i>		K= kontrol 1= RB1 2= RB2 3= RB3	
<i>Escherichia coli</i>		K=kontrol 1= CB1 2= CB2 3= CB3	
<i>Staphylococcus aureus</i>		K=kontrol 1= CB1 2= CB2 3= CB3	
<i>Escherichia coli</i>		K=kontrol 1= FB1 2= FB2 3= FB3	
<i>Staphylococcus aureus</i>		K=kontrol 1= FB1 2= FB2 3= FB3	

### Identifikasi Bakteri Endofit secara Molekuler dengan Gen 16S rRNA

Dalam penelitian ini, dilakukan isolasi bakteri endofit yang berasal dari tanaman *Carica papaya*. Bakteri-bakteri ini menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan kedua bakteri uji yang diidentifikasi secara molekuler. Isolat yang berasal dari akar diberi kode RB2, isolat dari batang diberi kode CB2, dan isolat dari daun diberi kode FB2. Proses identifikasi molekuler mikroorganisme melibatkan empat tahap utama, yakni ekstraksi DNA, PCR, elektroforesis, dan sekuensing. Tujuan dari ekstraksi DNA adalah

memisahkan DNA dari komponen sel lainnya sehingga diperoleh DNA yang murni. Ekstraksi DNA dilakukan dengan merusak dinding sel mikroorganisme agar DNA dapat keluar dari dalam sel (Harvianti, 2017).

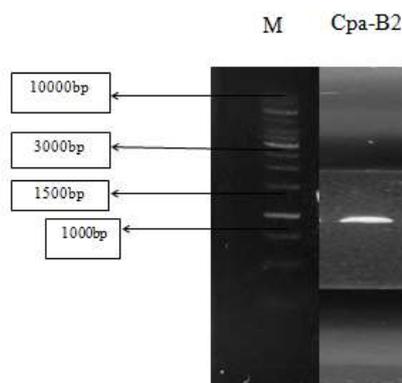
Proses isolasi DNA dengan menggunakan Kit Geneaid melibatkan serangkaian langkah yang penting untuk mendapatkan DNA yang murni dan berkualitas. Tahap pertama adalah preparasi sampel, di mana sampel biologis seperti jaringan tanaman atau sel mikroba diambil dan dipersiapkan untuk isolasi DNA. Langkah ini melibatkan penghancuran atau homogenisasi sampel untuk

membebaskan DNA dari sel-sel yang mengandungnya. Setelah preparasi sampel, langkah berikutnya adalah lisis sel. Pada tahap ini, dinding sel dan membran sel dipecah agar DNA yang terperangkap di dalamnya dapat terlepas. Ini biasanya dilakukan dengan menggunakan larutan lisis yang mengandung enzim dan bahan kimia yang menghancurkan struktur seluler. Setelah lisis sel, langkah selanjutnya adalah pengikatan DNA. DNA yang terlepas dari sel diikat pada kolom atau membran berbasis silika yang memiliki afinitas terhadap DNA. Proses pengikatan ini memungkinkan pemisahan DNA dari kontaminan seluler lainnya. Setelah pengikatan DNA, tahap pencucian dilakukan untuk menghilangkan sisa kontaminan seperti garam, protein, dan senyawa organik lainnya. Proses pencucian ini menggunakan larutan khusus yang membantu membersihkan DNA yang diikat pada kolom atau membran. Langkah terakhir dalam proses isolasi DNA adalah elusi. Pada tahap ini, DNA yang telah dibersihkan dari kontaminan dipulihkan dari kolom atau membran menggunakan larutan elusi yang sesuai. Elusi ini memungkinkan pemulihan DNA yang murni dan siap untuk digunakan dalam aplikasi berikutnya, seperti analisis PCR atau sekuensing. Dengan mengikuti langkah-langkah ini, proses isolasi DNA menggunakan Kit Geneaid dapat memberikan DNA yang berkualitas tinggi, bebas kontaminan, dan siap untuk digunakan dalam berbagai penelitian dan aplikasi biologi molekuler.

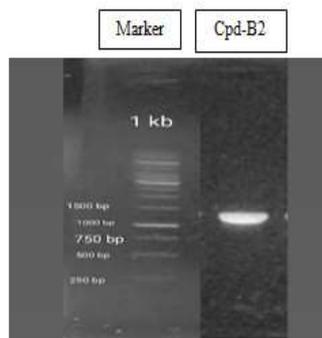
Setelah ekstraksi DNA, dilakukan amplifikasi dengan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*), yang bertujuan untuk menggandakan fragmen DNA tertentu. Proses PCR melibatkan tiga tahap siklus termasuk denaturasi

(pada suhu 95°C), *annealing* (pada suhu 55°C), dan *extension* (pada suhu 72°C). Proses PCR ini dilakukan selama 35 siklus, dengan total durasi sekitar 2 jam. Bahan-bahan yang digunakan dalam proses PCR termasuk ddH<sub>2</sub>O (air suling), Taq Master mix, *primer forward* (63F), *primer reverse* (1387R), dan MgCl<sub>2</sub>. Taq Master mix berfungsi sebagai campuran yang mengandung komponen yang diperlukan untuk amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR. *Primer forward* digunakan untuk memulai sintesis untai DNA dari ujung 5' ke 3', sementara *primer reverse* digunakan untuk memulai sintesis untai DNA dari ujung 3' ke 5'. DNA template berfungsi sebagai cetakan untuk sintesis molekul DNA baru yang identik. MgCl<sub>2</sub> berperan sebagai kofaktor yang merangsang aktivitas DNA polimerase. ddH<sub>2</sub>O digunakan sebagai pelarut untuk DNA (Harvianti, 2017).

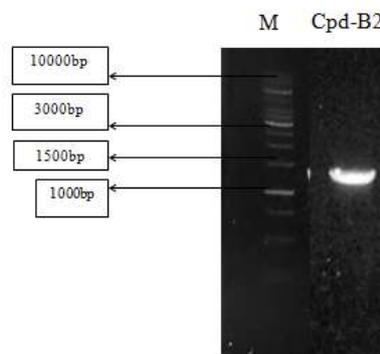
Setelah proses PCR, dilakukan tahap sekuensing DNA untuk menentukan urutan nukleotida dari fragmen DNA yang telah mengalami amplifikasi (Rahayu dan Nugroho, 2015). Melalui elektroforesis, produk PCR berupa DNA yang telah diamplifikasi dianalisis secara kualitatif untuk mengukur konsentrasi DNA yang dihasilkan dari proses tersebut. Pada hasil elektroforesis, terlihat adanya fragmen DNA dengan ukuran sekitar 1.300 bp yang terpisah dan dibandingkan dengan marka DNA, yang merupakan fragmen DNA standar yang digunakan sebagai pembanding dalam analisis (Herny et al., 2018). Elektroforesis DNA memberikan gambaran visual tentang kualitas dan ukuran fragmen DNA yang berhasil diamplifikasi, sehingga memungkinkan penilaian awal terhadap keberhasilan amplifikasi dan pemurnian sampel DNA sebelum dilakukan tahap sekuensing selanjutnya.



**Gambar 1.** Hasil Elektroforesis dari Produk Amplifikasi Gen 16S rRNA isolat RB2 (M : DNA marker).



**Gambar 2.** Hasil Elektroforesis dari Produk Amplifikasi Gen 16S rRNA isolat CB2



**Gambar 3.** Hasil Elektroforesis dari Produk Amplifikasi Gen 16S rRNA isolat FB2 (M : DNA marker)

Dalam melakukan proses sekuensing DNA, produk dari sampel PCR DNA dikirim ke First Base Pte. di Singapura. Data hasil sekuensing kemudian diambil dan diedit menggunakan perangkat lunak Geneious. Dalam perangkat lunak Geneious, dilakukan visualisasi dan pemilihan segmen DNA dengan kualitas pembacaan terbaik. Setelah itu, urutan nukleotida (*sekuens query*) dari segmen tersebut disalin dan dianalisis menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang dapat diakses secara online melalui website NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Analisis menggunakan program BLAST bertujuan untuk membandingkan urutan nukleotida yang diperoleh dengan urutan nukleotida yang ada dalam database GeneBank. Program ini akan mengidentifikasi dan mencocokkan urutan nukleotida dengan spesies bakteri yang memiliki kesamaan terbaik. Dengan demikian, kita dapat mengetahui nama bakteri dan tingkat kesamaan

urutan nukleotida dari DNA isolat dengan spesies bakteri yang sesuai dalam database GeneBank.

Melalui analisis BLAST, hasilnya mengungkapkan nama bakteri dan tingkat kesamaan urutan nukleotida antara DNA isolat dengan urutan nukleotida dari spesies bakteri yang sesuai dalam database GeneBank. DNA isolat RB2 menunjukkan tingkat kesamaan panjang nukleotida sebesar 99% dan memiliki kesesuaian sekuens sebesar 99.21% dengan *Bacillus cereus strain CCM 2010 16S ribosomal RNA*. DNA isolat CB2, yang berasal dari batang *Carica papaya*, diklasifikasikan sebagai bakteri *Bacillus sp.* dengan cakupan query sebesar 99% dan identitas sebesar 100%. Sementara itu, DNA isolat FB2 diklasifikasikan sebagai bakteri *Bacillus caries strain 46N2* dengan cakupan query sebesar 98% dan identitas sebesar 100%. Dalam hal ini, tingkat kesamaan panjang nukleotida mengindikasikan seberapa mirip urutan nukleotida DNA isolat dengan urutan nukleotida yang ada dalam database. Kesesuaian sekuens menunjukkan

sejauh mana urutan nukleotida DNA isolat cocok dengan urutan nukleotida spesifik dari bakteri yang telah teridentifikasi. Cakupan query mengacu pada seberapa banyak urutan nukleotida dari DNA isolat yang cocok dengan urutan nukleotida spesifik yang dijadikan query dalam database. Identitas

mengindikasikan persentase kesamaan antara urutan nukleotida DNA isolat dan urutan nukleotida spesifik dalam database. Semua informasi ini membantu dalam mengklasifikasikan isolat bakteri dan memberikan wawasan tentang tingkat kesamaan genetik dengan spesies yang terkait.

**Tabel 4 .** Hasil analisis BLAST isolat baktri endofit

Isolate	Deskripsi	Max Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per. Indent	Accession
RB2	<i>Bacillus cereus</i> strain CCM2010.16SrRNA gene partial sequence	2058	2058	99%	0.0	99.21%	NR115714.1
CB2	<i>Bacillus</i> sp. DU26(2010) 16SrRNA gene partial sequence	2349	2349	99 %	0.0	100 %	HM567080.1
FB2	<i>Bacillus cereus</i> strain 46N2 16SrRNA gene partial sequence	2343	2343	98%	0.0	100%	KX275400.1

## KESIMPULAN

Dalam penelitian ini, ada enam bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari tanaman *Carica papaya*. Setiap isolat diberi kode RB1, RB2, RB3, CB1, CB2, CB3, FB1, FB2, dan FB3. Seluruh isolat bakteri dari tanaman *Carica papaya* menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*, namun tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Isolat RB2, CB2, dan FB2 dari akar, batang, dan daun tanaman papaya menunjukkan daya antibakteri terbesar. Melalui analisis molekuler dengan menggunakan gen 16S rRNA, isolat RB2 dari bakteri endofit tanaman *Carica papaya* teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus*. Isolat CB2, yang berasal dari batang *Carica papaya*, teridentifikasi sebagai *Bacillus* sp. Sedangkan isolat FB2 teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus*

## REFERENSI

Chebota, V. K., N. V. Malfanova, a. V. Shcherbakov, G. a. Ahtemova, a. Y. Borisov, B. Lugtenberg, and I. a. Tikhonovich. 2015. "Endophytic Bacteria in Microbial Preparations That Improve Plant Development (Review)." *Applied Biochemistry and Microbiology* 51 (3): 271–77.

Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of

Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*17(4): 840-862.

Diyan Y, Fajriyah N, Wahyuni D, Murdiyah S. 2015. Pengaruh Kombucha Sari Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. Universitas Jember. XIII (2):32–6.

Harvianti, Y. 2017. Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Penghasil Fitase Asal Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) Berbasis Gen 16S rRNA. *Skripsi*. Fakultas Sains Dan Teknologi Uin Alauddin. Makassar.

Herny C. R, Yudistira, A., Herny E. I. S., 2018, Isolasi, Identifikasi Secara Molekuler Menggunakan Gen 16s rRNA, Dan Uji Aktivitas Antibakteri Bakteri Symbion Endofit Yang Diisolasi Dari Alga *Halimeda opuntia* *PHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT* Vol. 7 No. 2

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.

Mahardika, I.G. Ngurah K. 2005. *Polymerase Chain Reaction*. Jurnal Veteriner Vol.4 No. 1 : Bali

Martiasih Maria, Boy Rahardjo Sidharta, P. Kianto Atmodjo. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Pepaya terhadap *Escherichia coli* dan

- Streptococcus pyogenes*. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya, Yogyakarta*
- Nirosha N, Mangalanayaki R. 2013. Antibacterial Activity of Leaves and Stem Extract of CaricapapayaL. *International Journal of Advance in Pharmacy, Biology, and Chemistry*. 2(3):473-76.
- Noverita, Fitria, D., Sinaga, E. 2009. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit dari Daun dan Rimpang *Zingiberottensii* Val. *Jurnal FarmasiIndonesia*. 4(4): 171-176.
- Peter JK, Kumar Y, Pandey P, Masih H. Antibacterial Activity of Seed and Leaf Extract of *Carica papaya* var. Pusa dwarf Linn—*Journal of Pharmacy and Biological Science*.2014;9(2):29 37.
- Pratiwi EW, Praharani D, Arina YM. 2015. Daya Hambat Ekstrak Daun Pepaya *Carica papaya* L.) terhadap Adhesi Bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada Neutrofil. *Jurnal Pustaka Kesehatan Universitas Jember*.;3(2):193-198.
- Rahayu, D. A. dan Nugroho, E. D. 2015. *Biologi Molekuler dalam Perspektif Konservasi Plataxia, Yogyakarta*.
- Rini A, Supriatno, Rahmatan H. 2017. Skrining Fitokimia dan Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Kawista (*Limonia Acidissima* L.) dari Daerah Kabupaten Aceh Besar terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmiah UNSYIAH*. 2(1):1-11
- Ruby, E Jalgaonwala. 2011. "A Review: Bacterial Endophytes and Their Bioprospecting." *Journal of Pharmacy Research* 4 (3): 795–99.
- 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.
- Sunatmo, T. I. 2007. Eksperimen mikrobiologi dalam laboratorium. Penerbit Ardy Agency, Bogor.
- Tan, R. X. dan Zou, W. X. 2001. Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites. *Natural Product Reports*. 18: 448-459.
- Tuntun M. 2016. Uji Efektivitas Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya*L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Kesehatan Politeknik Kesehatan Tanjung Karang*; VII(3):4 97-502.
- World Health Organization. 2015. *Global Action Plan On Antimicrobial Resistance*. USA: Halaman 10-11.
- Wuluyo Lud. 2008, *Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi*. Malang: Unicersitas Muhammadiyah Malang.