

## Isolation and Identification of Endophytic Bacteria from the Andalas Plant Stem (*Morus macroua* Miq.)

Nisa Afifah\*, Irdawati\*, Dwi Hilda Putri\*

\*Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Padang

e-mail: [dwi\\_hildaputri@yahoo.com](mailto:dwi_hildaputri@yahoo.com)

**ABSTRACT.** *The number of death cause of infection continues to increase. Treatment of infections is increasingly difficult due to increased resistance of germs to existing antimicrobial compounds. A new source of antimicrobial substances is needed. One source of antimicrobial substances is endophytic bacteria that live in the stems of Andalas plants. The aim of this study was to compare the diversity of endophytic bacteria present in old and young Andalas plant stems. The method used to isolate endophytic bacteria from the stem of the Andalas plant is the streak plate method. Bacterial identification is done macroscopically and microscopically. The results of macroscopic observation showed that there are differences in the number of isolates found in old and young Andalas plant stems. 11 isolates of endophytic bacteria from Andalas plant stems, each of which consists of 9 isolates of endophytic bacteria from old Andalas stems and two isolates from young Andalas stems. A microscopic identification was found that of the 11 isolates, eight isolates were gram-positive and three isolates were gram-negative bacteria..*

*Key word: stem, Andalas, isolation, bacteria endophytic, identification*

**ABSTRAK.** *Angka kematian akibat infeksi terus meningkat. Penanganan infeksi semakin sulit karena meningkatnya resistensi kuman terhadap senyawa antimikroba yang ada. Dibutuhkan sumber zat antimikroba baru. Salah satu sumber zat antimikroba adalah bakteri endofit yang hidup dalam batang tumbuhan Andalas. Tujuan penelitian ini adalah untuk membandingkan keragaman bakteri endofit yang ada pada batang tumbuhan Andalas tua dan muda. Metode yang digunakan untuk mengisolasi bakteri endofit dari batang tumbuhan Andalas adalah metode streak plate. Identifikasi bakteri dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Hasil pengamatan secara makroskopis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah isolat yang terdapat pada batang tumbuhan Andalas tua dan muda. Diperoleh 11 isolat bakteri endofit dari batang tumbuhan Andalas, masing-masingnya terdiri dari 9 isolat bakteri endofit dari batang Andalas tua dan 2 isolat dari batang Andalas muda. Identifikasi secara mikroskopis diketahui bahwa dari 11 isolat yang berhasil diisolasi, delapan isolat merupakan bakteri gram positif dan tiga isolat merupakan bakteri gram negatif.*

*Kata kunci: Batang tumbuhan Andalas, bakteri endofit, isolasi, identifikasi*



## 1. PENDAHULUAN

Penyakit infeksi disebabkan oleh mikroba patogen. Berdasarkan data WHO (2017), angka kematian akibat infeksi di dunia semakin meningkat (Pelzar dan Chan, 2005). Dibutuhkan sumber zat antimikroba baru untuk mengatasi infeksi ini (Gurib-Fakim, 2006; Refdanita *et al.*, 2004). Sumber zat baru yang memiliki aktivitas antimikroba dapat berasal dari tumbuhan obat. Salah satu tumbuhan obat yang berpotensi adalah tumbuhan Andalas (*Morus macroura* Miq) (Kumar dan Chauhan, 2008; Zheng *et al.*, 2015).

Penelitian yang dilakukan Soekamto dkk., (2003) dan Hakim dkk., (2008) menunjukkan bahwa tumbuhan Andalas mempunyai beberapa senyawa kimia turunan stilben, yaitu *lunularin*, *oksiresveratrol*, *andalasin A*, *2-arilbenzofuran*, *morasin M*, turunan *kumarin*, *umbliferon*,  $\beta$ -*resolsiladehid*, *guangsangos A*, *albafuran* dan *andalasin b*. Senyawa kimia tersebut memiliki aktifitas antioksidan, neuroproteksi, antiviral, antijamur, dan antibakterial (Kumar dan Chauhan, 2008; Achmad dkk, 2006; Imran *et al.*, 2010).

Eksplorasi senyawa bioaktif langsung dari tumbuhan membutuhkan biomassa yang banyak dari bagian tumbuhan tersebut, sehingga tidak efisien (Imran *et al.*, 2010). Salah satu alternatif yang digunakan dalam eksplorasi bahan alam adalah pemanfaatan endofit (Zinniel *et al.*, 2002). Endofit merupakan mikroorganisme yang berada dalam jaringan tumbuhan hidup tanpa menimbulkan penyakit atau gangguan pada tumbuhan inangnya. Mikroorganisme endofit mampu memproduksi metabolit sekunder yang sama dengan tumbuhan inang (Maksum, 2005).

Bakteri endofit yang terdapat pada tumbuhan dipengaruhi oleh sumber tumbuhan, waktu pengambilan sampel, lingkungan, jenis jaringan dan umur tumbuhan (Zinniel *et al.*, 2002). Hasil penelitian Pranoto dkk (2014), menyatakan bakteri endofit dapat hidup dalam setiap jaringan tua maupun jaringan muda baik pada batang, daun dan akar. Zulkifli dkk (2016) dan Widayati (2007), berhasil mengisolasi mikroorganisme endofit berbagai jenis dan bagian tumbuhan. Menurut Sulistiyani dan Lisdiyanti (2016), bakteri endofit banyak terdapat pada bagian batang tumbuhan (50%). Bakteri endofit yang diisolasi dari bagian batang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan mikroba patogen (Purwanto dkk., 2014). Berdasarkan umur tumbuhan, keragaman bakteri endofit pada bagian tumbuhan yang lebih tua memiliki jenis bakteri endofit lebih bervariasi dibandingkan bagian tumbuhan muda (Park *et al.*, 2012).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri endofit yang ada pada batang tua dan muda tumbuhan Andalas.

## 2. METODE PENELITIAN

### 2.1 Sampel penelitian

Sampel batang Andalas diambil di desa Andaleh Kecamatan Batipuh, Tanah Datar, Sumatera Barat. Sampel batang tumbuhan Andalas diambil dari tumbuhan Andalas yang berumur puluhan tahun dan tumbuhan Andalas yang masih muda (anakan).

### 2.1 Sterilisasi permukaan

Jaringan batang Andalas dipotong 1x1 cm. Selanjutnya dilakukan sterilisasi permukaan dengan cara merendam di dalam alkohol 70% selama 1 menit. Potongan batang dicuci dengan aquadest steril dan dimasukkan ke dalam larutan hipoklorit (konsentrasi 1% dan 2% masing-masingnya untuk jaringan muda dan tua) selama 2 menit. Tahap selanjutnya jaringan direndam kembali dengan alkohol 70% selama 30 detik dan terakhir dicuci kembali dengan aquadest steril dan dikeringkan (Sari, 2013).

### 2.3 Isolasi bakteri endofit

Potongan batang yang sudah disterilisasi permukaan diletakkan ke dalam medium NA. Sebanyak tiga potongan jaringan batang diletakkan ke dalam cawan petri dengan posisi bagian dalam (floem) menempel ke medium. Selanjutnya medium diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu ruang. Bakteri yang tumbuh di sekitar jaringan secara bertahap dimurnikan. Teknik pemurnian menggunakan metode *streak plate* dan *spread plate* (Cappuccino, 2014).

Isolasi bakteri endofit juga dilakukan dengan cara menggerus jaringan menggunakan lumpang, selanjutnya dilakukan pengenceran sampai  $10^{-2}$ . Sebanyak 100  $\mu$ L hasil pengenceran diinokulasikan ke cawan petri yang berisi medium NA menggunakan metode *spread plate*. Cawan petri diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam. Setiap koloni yang tumbuh dimurnikan menggunakan metode *streak plate* sampai diperoleh koloni tunggal. Masing-masing isolat yang telah murni disimpan dalam biakan NA miring sebagai stok kultur.

### 2.4 Identifikasi bakteri

Identifikasi bakteri endofit dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan melihat morfologi koloni tunggal yang muncul setelah dilakukan metode *streak plate*. Pengamatan koloni tunggal berupa bentuk koloni, warna, tepian, dan elevasi koloni bakteri. Masing-masing bakteri endofit diamati di bawah mikroskop stereo dan difoto untuk dokumentasi (Pranoto, 2014). Pengamatan Mikroskopis dilakukan dengan mengamati hasil pewarnaan Gram. Pengamatan secara mikroskopis mengamati jenis bakteri Gram positif atau Gram negatif. Secara mikroskopis juga dilakukan pengamatan bentuk sel bakteri.

### 3. HASIL DAN DISKUSI

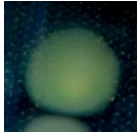
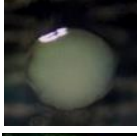
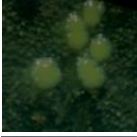
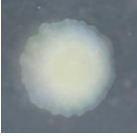

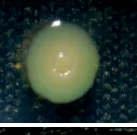
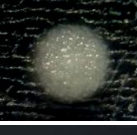
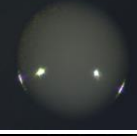



Jumlah isolat bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari batang tumbuhan Andalas sebanyak 11 isolat. Penelitian Sulistiyani dan Lisdiyanti (2016) menemukan bahwa keragaman bakteri endofit tanaman temu giring (*Curcuma heyneana*) bervariasi. Bakteri endofit banyak terdapat pada bagian batang tumbuhan yaitu sebanyak 50%, diikuti oleh akar 27% dan daun 23%. Blanco (2014), menyatakan bakteri endofit yang terdapat pada tumbuhan dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi berupa kandungan senyawa kimia yang dibutuhkan bakteri tersebut. Menurut Kumar dan Chauhan (2008), tumbuhan Andalas menghasilkan senyawa kimia terbanyak pada batang, sehingga kemungkinan bakteri endofit yang hidup pada batang juga akan tinggi.

Bakteri endofit yang diisolasi dari batang tumbuhan Andalas tua sebanyak 9 isolat, sedangkan bakteri endofit yang diisolasi dari batang tumbuhan Andalas muda sebanyak 2 isolat. Menurut Park *et al* (2012), keragaman bakteri endofit dipengaruhi oleh umur tumbuhan. Tumbuhan tua memiliki jenis bakteri endofit lebih bervariasi dibandingkan bagian tumbuhan muda.

Identifikasi bakteri endofit dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi secara makroskopis dilakukan dengan mengamati karakteristik koloni berupa: bentuk (*shape*), tepi (*edge*), ketinggian (*elevation*), dan warna (*colour*) (Cappuccino, 2014). Hasil pengamatan karakterisasi morfologi bakteri endofit batang tumbuhan Andalas dicantumkan pada Tabel 1.

Bhore dan Satisha (2010) menyatakan bakteri endofit pada suatu tumbuhan umumnya terdiri dari beberapa genus yang dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan tanaman khususnya kondisi tanah. Spesies tumbuhan yang sama dapat memiliki keragaman endofit yang berbeda-beda.

Tabel 1. Morfologi bakteri endofit dari batang tumbuhan Andalas.

Jaringan batang	Kode isolat	Morfologi koloni				Foto
		Bentuk	Tepi	elevasi	Warna	
Tumbuhan tua	B.J.T.A.21	Circular	Serrate	Flat	Putih susu	
	B.J.T.A.22	Circular	Undulate	Raised	Putih susu	
	B.J.T.A.3	Iregular	Lobate	Raised	Kuning	
	B.J.T.A.4	Circular	Undulate	Flat	Putih susu	
	B.J.T.C-4	Iregular	Lobate	Flat	Putih susu	
	B.J.T.B-6	Circular	Undulate	Umbonate	Putih susu	
	B.J.T.A-4	Circular	Undulate	Flate	Putih susu	
	B.J.T.A-6	Circular	Entire	Convex	Putih susu	
	B.J.T.C.2	Irregular	filamentous	Raised	Putih susu	
Tumbuhan muda	B.J.M.A 1.1	Circular	Entire	Raised	Putih susu	
	B.J.M.A.1.2	Circular	Lobate	Umbonate	Kuning	

Keterangan: B= Batang  
J= Jaringan  
T= Tua  
M= Muda

Pengamatan bakteri endofit secara mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram. Hasil penelitian diperoleh 8 isolat bakteri Gram positif dan 3 isolat bakteri Gram negatif. Bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari batang tumbuhan Andalas berbentuk *bacil* dan *coccus* (masing-masingnya 2 isolat dan 9 isolat). Hasil pewarnaan Gram bakteri endofit dari batang tumbuhan Andalas dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil pewarnaan gram bakteri endofit dari batang tumbuhan Andalas.

jaringan batang	Kode isolat	Gram +/-	Bentuk sel
Tumbuhan tua	B.J.T.A.2.1	-	<i>Coccus</i>
	B.J.T.A.2.2	-	<i>Coccus</i>
	B.J.T.A.3	+	<i>Coccus</i>
	B.J.T.A.4	+	<i>Coccus</i>
	B.J.T.C-4	+	<i>Bacil</i>
	B.J.T.B-6	+	<i>Coccus</i>
	B.J.T.A-4	+	<i>Coccus</i>
	B.J.T.A-6	+	<i>Coccus</i>
	B.J.T.C.2	+	<i>Bacil</i>
	Tumbuhan muda	B.J.M.A.1.1	-
B.J.M.A.1.2		+	<i>Coccus</i>

#### 4. PENUTUP

Berdasarkan identifikasi secara makroskopis didapatkan 11 isolat bakteri endofit dari batang tumbuhan Andalas. Jaringan batang tua memiliki jumlah bakteri endofit lebih banyak (9 isolat) dibandingkan jaringan batang muda (2 isolat). Berdasarkan identifikasi secara mikroskopis didapatkan 8 isolat bakteri endofit termasuk Gram positif dan 3 isolat bakteri endofit termasuk Gram negatif dengan 9 isolat berbentuk *coccus* dan 2 isolat berbentuk *bacil*. Selanjutnya perlu diuji kemampuan isolat-isolat ini dalam menghasilkan senyawa antimikroba

#### Daftar Pustaka

- Achmad, S.A., Hakim, E.H., Juliawaty, L.D; Makmur, L., Syah, M.Y. 2006. Hakekat Perkembangan Kimia Organik Bahan Alam dari Tradisional ke Moderen dan Contoh Terkait dengan Tumbuhan Lauraceae, Moraceae dan Dipterocarpaceae Indonesia. *Akta Kimindo*,1 (2): 55-66.
- Bhore, S.J., Sathisha, G. 2010. Screening of Endophytic Colonizing Bacteria for Cytokinin-Like Compounds: Crude Cell-Freebroth of Endophytic Colonizing Bacteria is Unsuitable in Cucumber Cotyledon Bioassay. *World Journal Of Agricultural Sciences.*, 6 (4): 345-352.
- Blanco, J.M., Lugtenberg, B.JJ. 2014. Biotechnological Applications of Bacterial Endophytes. *Current Biotechnology*, 3 (1) :61-75.
- Cappuccino, J.G., Sherman, N. 2014. *Microbiology A Laboratory Manual*. Tenth Edition. Person: USA.
- Djarmiko, H.A., Arwyanto, T., Hadisutrisno B., Sunarminto, B.H . 2007. Potensi dari Tiga Genus Bakteri dari Tiga Rhizosfer Tanaman Sebagai Agensia Pengendalian Hayati Penyakit Lincat. *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia*,9 (1): 40-47.

- Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal Plants: Traditions of Yesterday and Drugs of Tomorrow. *Molecular Aspects Of Medicine*,27 (2006): 1-93.
- Hakim, E.H, Syah, Y.M., Juliawati, L.D., Mujahidin, D. 2008. Aktifitas Antioksidan dan Inhibitor Tirosinase Beberapa Stilbenoid dari Tumbuhan Moraceae dan Dipterocarpaceae yang Potensial untuk Bahan Kosmetik. *Jurnal Matematika Dan Sains*,13 ( 2): 33-42.
- Imran, M., Khan, H., Shah, M., Khan, R., Khan, F. 2010. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Certain *Morus* Species. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*,11 (12): 973-980.
- Kumar, V.K., Chauhan, S. 2008. Mulberry: Life Enhancer. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (10): 271-278.
- Maksum, R. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2 (3): 113 – 126.
- Park, Y.W., Kim, Y.C., Park, S.U., Lim, H.S., Kim, J.B., Cho, B.K., Bae, H. 2012. Age-dependent Distribution of Fungal Endophytes in *Panax ginseng* Roots Cultivated in Korea. *Journal Ginseng Res*,36 (3): 327-333.
- Pelczar. M.J., Chan, E.C.S. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi* Jilid 2. Terjemahan oleh Hadioetomo. Jakarta: UI Press.
- Pranoto, E., Fauzi, G., Hingdri. 2014. Isolation and Characterization of Endophyt Bacteria on Highland Productif and Young Tea Plant (*Camellia Sinensis* (L.) O. Kuntze). *Biospecies*,7 (1): 1-7..
- Prosiding Workshoop. Improving Appre Prosiding Workshoop Ciation and Awareness on Concervation of High Value Indigenous Wood Species of Sumatera. *ITTO project.PD. 710/ 13 REV.1. Pekanbaru, 23 April, 2005.*
- Purwanto, U.M.S., Pasaribu, F.H., Bintang, M. 2014. Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Potensinya sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri. *Current biochemistry*,1(1): 51-57.
- Sari, K.I.P., Periadnad., Nasir, N. 2013. Uji Antimikroba Ekstrak Segar Jahe-Jahean (Zingiberaceae) terhadap *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* dan *Candida Albicans*. *Jurnal Biologi Universitas Andalas (J. Bio. Ua.)*, 2 (1): 20-24.
- Simarmata, R., Lekatompessy, S., Sukiman, H. 2007. Isolasi Mikroba Endofit dari Tanaman Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) dan Analisis Potensinya Sebagai Antimikroba. *Berk. Penel. Hayati*,13: 85– 90.
- Soekamto N. M., Achmad S.A., Gishalberti E.L., Aimi, N, Hakim, E.H., Syah Y.M. 2003. Beberapa Senyawa Fenol dari Tumbuhan *M. macroura* Miq. *Jurnal Matematika dan Sains*,8 (1): 35-40.
- Sulistiyani, T.R., Lisdiyanti. 2016. Diversity of Endophytic Bacteria Associated with *Curcuma heyneana* and Their Potency for Nitrogen Fixation. *Widyariset*,2 (2): 106 – 117.
- World Health Organization. Global Health Observatory (GHO) Data. 2017.
- Zheng, Q. Chen, H. 2015. Definition of Eight Mulberry Species in the Genus *Morus* by Internal Transcribed Spacer-Based Phylogeny. *Journal.pone*,10 (8): 1-13.
- Zinnieal, D.K., Lambrech, P., Harris, V., Feng, Z., Kuczmarsi, D., Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A., Barletta, R.G., Vidaver, A.K. 2002. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteri from Agronoric Cropss and Primitive Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (5): 2198-2208.
- Zulkifli, L., Soelistya, D., Jekti, D. Mahrus, N., Rasmi, C. 2016. Isolasi Bakteri Endofit dari Sea Grass yang Tumbuh di Kawasan Pantai Pulau Lombok dan Potensinya sebagai Sumber Antimokroba terhadap Bakteri Patogen. *Jurnal Biologi Tropis*, 16(2):80-93