

SCREENING AND IDENTIFICATION ENDOPHYTIC BACTERIA FROM INDONESIAN BAY LEAVES (*Eugenia polyantha* WIGHT) WITH ANTIBACTERIA ACTIVITY

Wahyu Hidayati¹⁾, Fitri Yuniarti¹⁾, Lulu Shofaya¹⁾, Sigit Priyo Utomo¹⁾, dan Lutfika Munaziah¹⁾

¹⁾Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA

ABSTRACT-For many years, herbs already utilized as traditional medicine to cure diseases, particularly bacterial infections. One of potential herbs which reported has antibacterial activity is *Eugenia polyantha* Wight. This herbs is commonly used as spices for food by Indonesian people. Due to the significant increasing of multidrug resistance bacteria globally, the invention of new antibiotics is urgently needed. One of alternative ways finding active compounds to solve the problems is by using microbes inside plants. Unfortunately, no reports about endophytic bacteria from Indonesian Bay Leaves especially its potential as antibacterial. This research aimed to find endophytic bacteria isolates from Indonesian Bay Leaves which has antibacterial activity against *Salmonella typhi*. First, we isolated the bacteria from fresh *E. polyantha* leaves on agar medium then cultivated it using NB medium and continued to antibacterial assay by disc diffusion. The 16 sRNA of isolate with inhibition ability was sequenced. We got three endophytic bacteria isolates but only one isolate shown great antibacterial activity. According to the similarity result by BLAST analysis the isolate had similarity to *Bacillus* sp, thus, we named the isolate with *B. subtilis* strain WL-SM1.

Keywords: *Eugenia polyantha*, endophytic bacteria, antibacterial, *Bacillus subtilis*, BLAST

Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang berada di kawasan tropis dengan beragam tumbuhan obat yang dimilikinya. Lebih dari 1000 jenis tumbuhan yang tersebar di Indonesia dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat dikarenakan adanya kandungan senyawa bioaktif di dalamnya (Radji 2005). Senyawa bioaktif pada tanaman diketahui berasal dari hasil interaksi antara tanaman dan mikroba endofit. Dari sekitar 300.000 jenis tanaman yang tersebar di muka bumi, masing-masing tanaman mengandung satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari bakteri atau fungi (Strobel & Daisy 2004). Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman inang tanpa merugikan tanaman inangnya. Bakteri endofit mampu memproduksi metabolit sekunder yang memiliki bioaktivitas seperti enzim, zat pengatur tumbuh, antimikroba, antifungi, dan antikanker (Kumala 2014).

Tumbuhan salam (*Eugenia polyantha* Wight) merupakan tumbuhan yang banyak tumbuh di Indonesia. Salam termasuk ke dalam famili *myrtaceae* dan sering dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai bahan tambahan masakan. Secara empiris, tanaman ini telah digunakan oleh masyarakat Indonesia sebagai obat untuk mengobati beberapa penyakit infeksi antara lain diare (Hariana, 2006). Trisharyanti & Febriani (2017) melaporkan bahwa ekstrak etanol 96% daun salam memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan

Salmonella typhi dengan konsentrasi ekstrak sebesar 10%. Penelitian yang dilakukan oleh Malik & Ahmad (2013) memperlihatkan adanya aktivitas antidiare pada ekstrak etanol 70% dengan dosis 30% secara *in vivo*.

Adanya informasi mengenai kemampuan bakteri endofit menghasilkan senyawa-senyawa dengan bioaktivitas yang beragam seperti antibakteri. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan bakteri endofit daun salam yang memiliki aktivitas antibakteri secara *in vitro* dikarenakan belum adanya informasi mengenai bakteri endofit daun salam yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Lebih jauh, penelitian ini juga akan melakukan identifikasi bakteri endofit dengan aktivitas antidiare menggunakan gen 16 sRNA.

Kajian Pustaka

Tanaman Salam

Tumbuhan Salam adalah nama pohon penghasil daun rempah yang digunakan dalam masakan nusantara. Daun salam digunakan terutama sebagai rempah pengharum masakan di sejumlah negeri di Asia Tenggara, baik untuk masakan daging, ikan, sayur mayur, maupun nasi. Salam tumbuh liar di hutan dan pegunungan, atau ditanam di pekarangan atau disekitar rumah. Tanaman ini dapat ditemukan di dataran rendah sampai 1400 m dpl.

Salam merupakan pohon dengan tinggi mencapai 25 m, batang bulat, permukaan licin, \pm 25cm, putih kecoklatan. Daun majemuk, menyirip genap, permukaan licin, tepi rata, ujung meruncing, pangkal runcing, panjang 10-14cm, lebar 4-8 cm, tangkai panjang \pm 1 cm, pertulangan menyirip, permukaan atas hijau tua, permukaan bawah hijau muda. Bunga majemuk, tumbuh diujung batang, kelopak berbentuk piala, diameter 4 mm, hijau mahkota panjang 2-3 mm, putih, putik panjang 1-2 mm, hijau keputih-putihan. Buah buni, bulat, diameter \pm 1-2 cm, masih muda hijau setelah tua coklat kehitaman. Biji bulat, diameter \pm 1 cm, coklat. Akar tunggang, coklat muda (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 1997).

Antibakteri dan Uji Potensi Antibakteri

Produk alam berupa molekul organik yang dibuat oleh mikroorganisme yang pada konsentrasi rendah aktif untuk melawan mikroorganisme lain disebut sebagai antibakteri. Salah satu sumber antibakteri adalah mikroba endofit. Produk alami yang dihasilkan dari mikroba endofit telah diobservasi dapat menghambat atau membunuh berbagai penyakit berbahaya yang disebabkan oleh phytopatogen, bakteri, jamur, virus dan protozoa yang mempengaruhi manusia dan hewan. Berdasarkan sifat toksisitas selektifnya antibakteri terbagi menjadi tiga yaitu bakteristatik, bakterisidal dan bakteriolitik. Bakteristatik adalah zat yang hanya menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan bakterisidal adalah zat yang dapat membunuh sel tetapi tidak terjadi lisis sel atau pecah sel. Sedangkan bakteriolitik menyebabkan sel menjadi lisis atau pecah sel sehingga jumlah sel berkurang atau terjadi kekeruhan setelah penambahan antimikrobia (Madigan *et al* 2000). Berdasarkan spektrumnya, antibakteri terbagi menjadi spektrum luas dan spektrum sempit. Spektrum luas adalah zat yang aktif terhadap bakteri Gram negatif (-) dan Gram positif (+), sedangkan spektrum sempit adalah zat yang aktif terhadap Gram (-) atau Gram (+) saja.

Uji potensi bakteri endofit sebagai antibakteri dapat dilakukan dengan berbagai metode yaitu metode difusi dan metode dilusi. Metode difusi terbagi menjadi tiga yaitu difusi cakram dengan menggunakan kertas cakram yang telah direndam ke dalam zat antibakteri, difusi silinder dengan menggunakan tabung silinder yang diletakkan tegak lurus pada lapisan agar padat dalam cawan petridan metode lubang atau sumuran dengan membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diinjeksikan dengan ekstrak yang akan diuji. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang (Kusmiyati dan Agustini, 2007).

Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu dilusi cair dan dilusi padat. Metode dilusi cair dilakukan dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai kadar hambat minimal (KHM). Metode dilusi padat sama dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (Pratiwi 2008).

Metode

Penyiapan Sampel dan Identifikasi Tanaman

Sampel tanaman diambil dari wilayah Tangerang sedangkan identifikasi tanaman dilakukan di Herbarium Bogoriense, Balitbang Botani, Puslitbang Biologi LIPI, Bogor

Isolasi Bakteri Endofit

Tahapan isolasi dilakukan dengan menggunakan metode yang dilakukan oleh Kumala (2009) dengan sedikit perubahan. Adapun metode tersebut adalah diawali dengan pencucian sampel daun salam segar dengan air mengalir hingga bersih dan dilanjutkan dengan sterilisasi permukaan. Sterilisasi permukaan dilakukan dengan merendam daun pada larutan etanol 75% selama 1 menit, kemudian sampel dipindahkan pada wadah berisi larutan Natrium Hipoklorit 5,3% dan direndam selama 5 menit dan terakhir daun dibilas kembali dengan etanol 75% selama 30 detik. Daun kemudian dikeringanginkan guna menghilangkan uap etanol. Sebelum diletakkan pada medium NA yang telah ditambahkan nistatin 0,01%, daun dipotong kecil dengan ukuran 1cm. Setelah daun diletakkan pada medium NA tersebut dilanjutkan inkubasi pada suhu kamar terlihat adanya isolat bakteri yang tumbuh disekitar daun (Pratiwi 2015).

Karakterisasi Morfologi dan Pewarnaan Gram

Karakterisasi morfologi dilakukan dengan dua pengamatan yaitu makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopik dilakukan dengan mengamati warna koloni, bentuk koloni, pinggiran koloni dan permukaan koloni. Pengamatan makroskopis dilakukan secara kasat mata, sedangkan pengamatan mikroskopis dilakukan menggunakan mikroskop binokuler. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mengamati bentuk dan wran sel setelah dilakukan pewarnaan Gram.

Pewarnaan gram dilakukan diawali dengan menggoreskan bakteri diatas kaca objek dan difiksasi. Goresan bakteri tersebut kemudian ditetaskan kristal violet sebanyak satu tetes dan didiamkan selama 1 menit dilanjutkan dengan pencucian di bawah air mengalir lalu dikeringanginkan. Larutan lugol kemudian ditetaskan dan didiamkan selama 1 menit lalu dicuci dan dikeringanginkan. Warna lugol yang menempel kemudian dibersihkan

dengan pemberian larutan alkohol 96% kemudian dicuci dan dikeringanginkan. Pemberian safranin sebanyak satu tetes dilakukan setelah uap alkohol menghilang dan dilanjutkan dengan inkubasi selama 45 detik (Madigan 2007).

Fermentasi Skala Kecil

Isolat yang telah dimurnikan dan diremajakan dikultivasi selama 1 hingga 7 hari pada 5 ml medium NB dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruang. Hasil fermentasi dikoleksi setiap 24 jam sejak 24 jam pertama hingga hari ketujuh. Supernatan dipisahkan dari sel bakteri endofit menggunakan teknik sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Supernatan disimpan pada suhu 4°C (Kumala dkk. 2007).

Skrining Isolat Bakteri Daun Salam dengan Aktivitas Antibakteri Secara *In Vitro*

Skrining dilakukan dengan metode *disc diffusion* terhadap bakteri *Salmonella typhi*. Tahapan ini diawali dengan penyediaan medium uji. Medium uji dibuat dengan mencampur medium Muller Hinton Agar (MHA) dengan bakteri uji *Salmonella typhi* yang telah dikultivasi dan mencapai transmitan sebesar 25%. Adapun perbandingan *S. typhi* dengan medium MHA adalah 1:10. Setelah medium uji memadat, kertas cakram yang telah direndam dalam supernatan hasil fermentasi bakteri endofit selama 5 menit diletakkan pada medium uji tersebut dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari (Simarmata dkk. 2007).

Isolasi DNA genom isolat bakteri dengan aktivitas antidiare

Isolasi dilakukan menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega, USA). Metode isolasi dilakukan sesuai dengan protokol yang terdapat pada kit tersebut. Isolat bakteri yang akan digunakan untuk proses isolasi, terlebih dahulu dikultur dalam medium *Nutrient Broth*(NB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tahap awal yang dilakukan adalah memasukan bakteri endofit yang telah dikultur sebanyak 1ml kedalam mikrotube 1.5ml, kemudian sentrifuse pada kecepatan 15.000 x g selama 2 menit, buang supernatan hingga tersisa peletnya saja. Kemudian campurkan 480µl EDTA 50mM kedalam mikrotube yang berisi pelet, setelah itu tambahkan 120µl lisozim dan lakukan pipeting agar semua bahan dan pelet tercampur, inkubasi sampel pada suhu 37°C selama 30-60 menit, setelah diinkubasi sentrifuse sampel 15.000 x g selama 2 menit, setelah terpisah buang supernatan.

Tahap selanjutnya tambahkan 600µl *nuclei lysis solution* kedalam tube yang berisi pelet, lakukan pipeting agar tercampur dengan baik, kemudian inkubasi pada suhu 80°C selama 5 menit, dan dinginkan pada suhu ruang. Setelah dingin tambahkan 3µl *RNAse Solution*, bolak balik tube 2-5 kali untuk mencampurnya. Kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 15-60 menit, dinginkan pada suhu ruang. Tahap berikutnya tambahkan 200µl *Protein Precipitation Solution*, kocok selama 20 detik. Inkubasi sampel didalam es selama 5 menit, sentrifuse dengan kecepatan 15.000 x g selama 3 menit. Tuang supernatan kedalam mikrotube baru yang telah terisi isopropanol 600µl. Tutup mikrotube dan bolak balik secara perlahan, secara kasat mata akan terlihat seperti ada benang putih di dalam mikrotube, kemudian sentrifuse 15.000 x g selama 2 menit. Buang supernatan secara hati-hati, sehingga hanya pelet saja yang tersisa. Cuci pelet dengan menambahkan 600µl etanol 70%, lakukan pengocokan agar pencucian DNA merata, sentrifuse 15.000 x g selama 2 menit. Buang etanol secara hati-hati agar pelet tidak ikut terbang, keringkan tube dari sisa etanol selama 10-15 menit. Tahap akhir yang dilakukan adalah tambahkan 100µl *Rehydration solution* ke dalam tube yang telah berisi DNA, kemudian inkubasi

selama 1 jam pada suhu 65⁰C, kemudian simpan DNA pada suhu 2-8⁰C. Visualisasi hasil isolasi genom dilakukan pada gel agarosa 0.8% di atas sinar UV setelah proses elektroforesis.

Amplifikasi dan Identifikasi Gen 16sRNA

Proses amplifikasi dengan teknik PCR dilakukan berdasarkan protokol *Go Taq® Green Master Mix* dengan menggunakan primer *forward* 27F (5' AGA GTT TGA TC(AC) TGG CTC AG 3') dan primer *reverse* 1492R (5' TAC GG(CT) TAC CTT GTT ACG A 3') (Rosita, 2012). *Go Taq Green Master Mix* sebanyak 12.5 µl di masukkan ke dalam tube 0.5ml, tambahkan primer 27F 2.5 µl, primer 1492R 2.5µl, dan *Nuclease-free water* 4.5 µl, lalu dihomogenkan. DNA Template 3 µl, ditambahkan kedalam campuran tersebut, lakukan pipeting agar tercampur sempurna. Amplifikasi dilakukaknsebanyak 30 siklus pada proses denaturasi (94° C, 1 menit), annealing (50° C, 1 menit), dan elongasi (74° C, 2 menit). Sebelum denaturasi dilakukan tahapan pre-denaturasi selama 3 menit pada suhu 94° C dan setelah elongasi dilakukan *final extention* pada suhu 72° C selama 10 menit. Hasil amplifikasi diamati pada gel agarosa 0.8% pada alat transilluminator sinar UV.

Identifikasi gen 16sRNA isolat bakteri endofit WL-SM1

Identifikasi dilakukan dengan menggunakan data urutan DNA gen 16sRNA isolat WL-SM1 yang telah diolah menggunakan *software* GENEIOUS R11. Data tersebut kemudian dianalisa secara daring pada laman www.ncbi.nlm.nih.gov dengan menggunakan *tool* blast terhadap gen 16sRNA bakteri.

Hasil dan Pembahasan

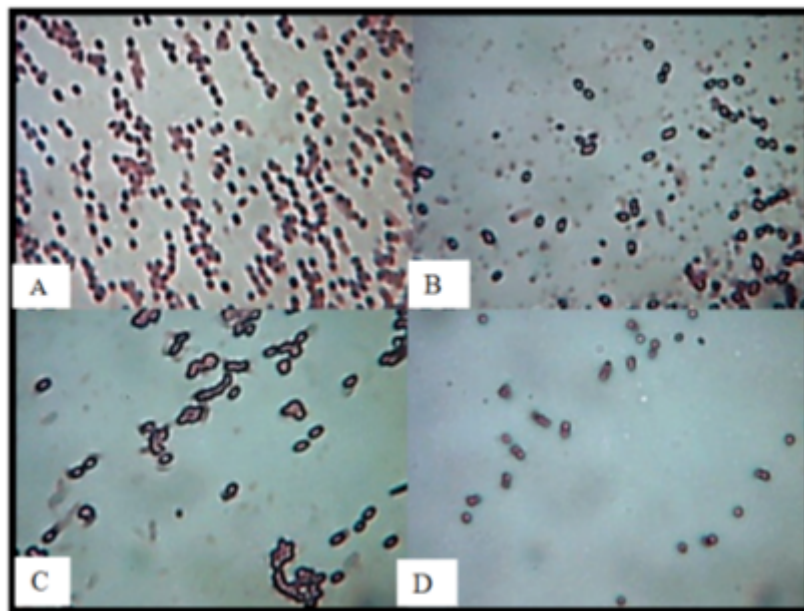
Isolasi dan Karakterisasi Makroskopis dan Mikroskopis

Di dalam jaringan tanaman, baik akar, batang, dan daun, terdapat bakteri endofit yang hidup bersimbiosis dengan tanaman dan membentuk koloni di dalamnya (Bacon & White, 2000). Bakteri endofit dapat diperoleh dengan metode tanam langsung maupun pengenceran. Pada penelitian ini, bakteri endofit diisolasi dengan menggunakan metode tanam langsung di mana potongan daun yang telah disterilisasi diletakkan pada permukaan medium agar. Sterilisasi perlu dilakukan untuk menghindari munculnya bakteri epifit daun. Bakteri endofit akan muncul pada bagian tepi daun (gbr 1). Hal ini disebabkan jaringan pada bagian tepi daun mengalami kontak langsung dengan medium agar di mana medium tersebut mengandung nutrisi yang baik bagi pertumbuhan bakteri.

Tabel 1. Karakteristik Makroskopis dan Mikroskopis

Kode isolat	Bentuk	Warna	Elevasi	Tepian	konsistensi	Bentuk sel	Warna sel
WL-SB	Tak beraturan	Putih	Datar	Tak beraturan	Berlendir	Basil pendek	Ungu
WL-SK	Bundar	Putih	Cembung	Tak beraturan	Berlendir	Bulat	Merah
WL-SM1	Bundar	Putih	Datar	Tak beraturan	Berlendir	Basil pendek	Ungu
WL-SM2	Bundar	Putih	Cembung	Tak beraturan	Berlendir	Bulat	Ungu

Pada penelitian ini diperoleh empat isolat bakteri endofit yang memiliki perbedaan secara makroskopis dan mikroskopis (table 1). Pengamatan makroskopis dan mikroskopis perlu dilakukan untuk mengetahui karakteristik isolat bakteri yang diperoleh. Salah satu karakteristik yang penting dan diperlukan pada tahap isolasi DNA adalah ada tidaknya peptidoglikan pada membrane sel bakteri. Karakteristik tersebut dapat diketahui dengan melakukan pewarnaan Gram (Pratiwi, 2008). Berdasarkan data pada tabel 1, diketahui bahwa hanya bakteri WL-SK yang tidak memiliki peptidoglikan yang dicirikan dengan penampakan merah pada sel bakteri jika dilihat di bawah mikroskop.



Gambar 1. Hasil pewarnaan Gram. A. Isolat WL-SM1, B. Isolat WL-SM2, C. Isolat WL-SB, D. Isolat WL-SK

Skrining Isolat Bakteri Endofit dengan Aktivitas Antidiare Secara *in vitro*

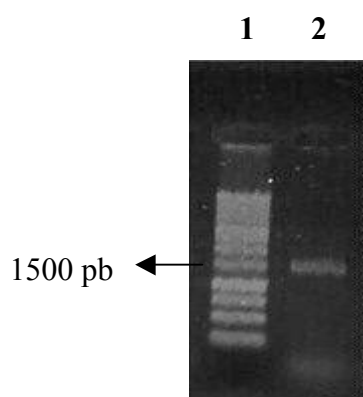
Mikroorganisme endofit dapat menghasilkan metabolit sekunder yang tidak hanya bermanfaat bagi tanaman inang namun juga bagi manusia. Telah diketahui, bahwa keberadaan mikroba endofit di dalam tanaman inang memberikan keuntungan bagi tanaman tersebut seperti membantu pertumbuhan tanaman, dan menghasilkan metabolit sekunder yang dapat melindungi tanaman dari hama, serangga, dan pathogen. Beberapa penelitian juga melaporkan bahwa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroba endofit, khususnya bakteri endofit, memiliki kemampuan untuk menghasilkan metabolit sekunder yang serupa dengan inangnya dan memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan sel-sel kanker, menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen, dan memiliki aktivitas antioksidan.

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap Bakteri *Salmonella typhi*

Isolat Bakteri Endofit Daun Salam	Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap <i>S. typhi</i>
WL-SB	-
WL-SK	-
WL-SM1	+
WL-SM2	-

Penemuan senyawa medisinal baru sangat penting dilakukan karena penemuan obat-obatan baru tidak sepesat dengan kemunculan mikroba pathogen yang resisten terhadap antibiotik. Salah satu sumber yang potensial untuk dieksplorasi adalah mikroba endofit. Isolasi mikroba endofit sebagai sumber penghasil senyawa antidiare diawali dengan pemilihan tanaman yang telah digunakan untuk mengobati diare (Tanvir et al., 2016). Sebagaimana telah dipaparkan sebelumnya bahwa secara empiris daun Salam telah digunakan untuk mengobati penyakit diare dan beberapa penelitian juga melaporkan bahwa ekstrak daun Salam memiliki aktivitas antidiare secara *in vitro*.

Pada penelitian ini digunakan bakteri *S. typhii* sebagai mikroba pathogen untuk uji aktivitas antidiare secara *in vitro*. *Salmonella typhii* merupakan salah satu bakteri pathogen penyebab penyakit typhus dan sering digunakan sebagai mikroba uji untuk aktivitas antidiare (WHO ; Tan & Vairappan, 2011; Trisharyanti 7 Febriani, 2017; Arunachalam C & Gayathri, 2010) . Berdasarkan uji aktivitas dengan menggunakan metode *disc diffusion* terlihat adanya zona bening di sekitar kertas cakram yang telah direndam dalam hasil fermentasi isolat WL-SM1.



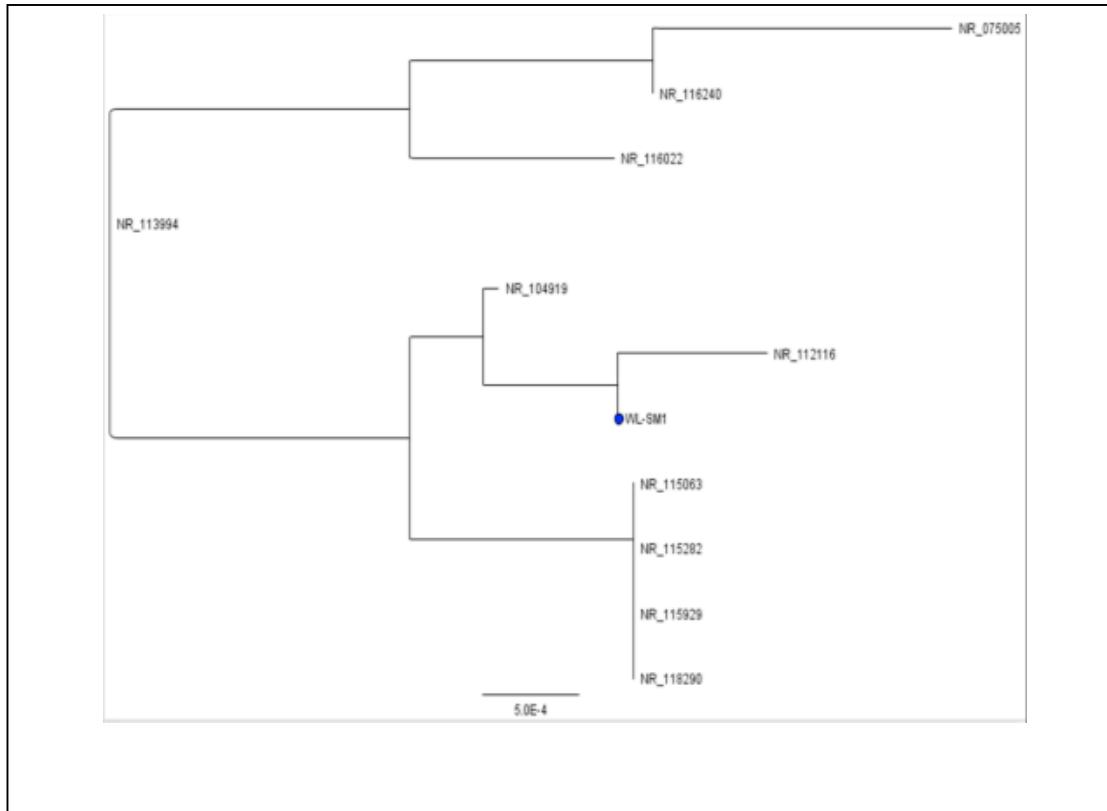
Gambar 2. Hasil Elektroforesis Amplikon Isolat Bakteri WL-SM1. 1: DNA Ladder 1kb, 2: Amplikon isolat bakteri endofit WL-SM1

Identifikasi Isolat SM-WL1 berdasarkan gen 16sRNA

Isolat bakteri endofit dapat diidentifikasi dengan menggunakan informasi yang terdapat pada urutan basa DNA. Organisme prokariot memiliki tiga jenis RNA ribosomal, yaitu 5S, 16S, dan 23S rRNA. Dari ketiga jenis tersebut 16S rRNA yang paling sering digunakan, karena molekul 5S rRNA memiliki urutan basa terlalu pendek, sehingga tidak ideal sementara molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang, sehingga menyulitkan analisis. Gen 16S rRNA merupakan gen yang bersifat spesifik terhadap spesies prokariot sehingga gen 16S rRNA dapat digunakan untuk mempelajari hubungan filogenetik dari suatu spesies bakteri (Clarridge, 2004).

Gen 16sRNA dapat diperoleh dengan teknik *Polymerase Chain reaction* (PCR) menggunakan primer 27F dan 1492R. Kedua primer tersebut akan secara spesifik menempel pada urutan basa nukleotida yang terdapat pada gen 16sRNA . Adapun besaran gen 16sRNA dengan menggunakan pasangan primer tersebut sekitar 1500 pasang basa (gbr). Fragmen DNA hasil PCR yang dikenal dengan istilah amplikon akan digunakan sebagai sumber informasi saat proses sekuensing. Sekuensing merupakan suatu teknik untuk membaca urutan basa nukleotida pada satu untai DNA (Brown, 1995; Sambrook et

al., 1989). Berdasarkan data yang diperoleh dari proses sekuensing, suatu organisme dapat diketahui identitasnya dengan melakukan perbandingan kemiripan nukleotida terhadap seluruh data DNA yang terdapat pada bank DNA atau *gene bank*. Proses pencarian identitas dengan menggunakan *gene bank* dilakukan secara daring pada laman www.ncbi.nlm.nih.gov.



Gambar 3. Hasil analisa filogenetik DNA isolat bakteri WL-SM1 dengan 10 isolat bakteri secara daring pada laman www.ncbi.nlm.nih.gov.

Data nukleotida yang diperoleh pada penelitian ini setelah dibandingkan dengan data gen 16sRNA bakteri pada *gene bank* memiliki kemiripan dengan gen 16sRNA beberapa bakteri *Bacillus* sp dengan persen kemiripan lebih dari 99%. Analisis lebih lanjut dilakukan dengan menggunakan pohon filogenetik untuk mengetahui spesies *Bacillus* yang paling dekat kekerabatannya dengan isolate WL-SM1. Berdasarkan informasi pada pohon filogenetik, isolate WL-SM1 memiliki kekerabatan yang dekat dengan bakteri *Bacillus subtilis* strain IAM 12118 (NR_112116) dengan persen kemiripan sebesar 99,9%, sehingga isolate bakteri endofit pada penelitian ini dapat diberi nama dengan *B. subtilis* strain WL-SM1.

Simpulan

Penelitian ini memperlihatkan bahwa pada daun Salam terdapat bakteri endofit dan dari empat isolat yang diperoleh hanya satu yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi* secara *in vitro*. Hasil analisa sekuens menunjukkan bahwa isolat WL-SM1 memiliki kemiripan dengan *Bacillus* spp dan berkerabat dekat dengan *B. subtilis* strain IAM 12118 (NR_112116).

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Lembaga Penelitian dan Pengembangan UHAMKA Tahun Anggaran 2016-2017.

Daftar Pustaka

- Arunachalam C & Gayathri P. Studies on Bioprospecting of Endophytic Bacteria from The Medicinal Plant of *Andrographis paniculata* for Their Antimicrobial Activity and Antibiotic Susceptibility Pattern. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 2(4):63-68.
- Bacon CW & White J. 2000. Microbial endophytes. CRC Press.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 1997. Inventaris Tanaman Obat Indonesia Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan . Hlm. 105-106
- Brown TA. 1995. Gene Cloning : An Introduction. Stanley Thomas.
- Clarridge JE. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Journal Clinical Microbiology Reviews*. 17: Hlm. 840-860.
- Hariana A. 2006. Seri Agrisehat Tumbuhan Obat dan khasiatnya seri 3. Niaga swadaya. Hal 20-22
- Kumala, S. 2014. Mikroba Endofit: Pemanfaatan Mikroba Endofit dalam Bidang Farmasi. PT. ISFI Penerbitan. Jakarta. Hlm. 15-48
- Kusmiyati, & Agustini NWS. 2007. Uji Aktifitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga. Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Hlm. 48-53
- Lee TK & Vairappan CS. 2011. Antioxidant, Antibacterial and Cytotoxiic Avtivities of Essential Oils and Ethanol Extracts of Selected South East Asian herbs. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(21): 5284-5290.
- Madigan M, Martiko JM, Stahl DA, & Clark DP. 2012. Brock Biology of Microorganisms. 13th Edition. Wageningen Agricultural University. Netherlands. Hlm. 129-130.
- Malik A & Ahmad AR. 2013. Antidirrheal Activity of Ethanolic Extract of Bay Leaves (*Syzigium polyanthum* [Wight] Walp.). *Int. Res. J. Pharm.* 4(4). DOI: 10.7897/2230-8407.04418
- Pratiwi, S. T. (2008). Mikrobiologi Farmasi. Jakarta: Penerbit Erlangga. Hlm. 188-192
- Promega Corporation. 2012. Go Taq Green Master Mix. USA. Hlm 1-2
- Promega Corporation. 2014. Wizard Genomic DNA Purification Kit. USA. Hlm 14-15
- Radji, M. (2005). Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2 (3). Hlm. 113-126
- Rosita A. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit dari Umbi Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) menggunakan Primer PCR-RAPD. Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri, Malang. Hlm. 62-68.
- Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 1. Cold Harbor Laboratory.

- Simarmata R, Lekatompessy S, & Sukiman H. 2007. Isolasi Mikroba Endofitik dari Tanaman Obat Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) dan Analisis Potensinya sebagai Antimikroba. *Jurnal Berkala Penelitian Hayati*. 13: 85-90
- Strobel G, Daisy B, Castillo U, & Harper J. 2004. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *J.Nat.Prod.*67: 257-268.
- Strobel GA. 2002. Rainforest Endophytes and Bioactive Products. *Critical Reviews in Biotechnology*. 22 (4): 315-333.
- Sumono A, Wulan A. The Use of Bay Leaf (*Eugenia polyantha* Wight) in Dentistry. *Dental Journal*. 41 (3): 147-150.
- Tanvir R, Javeed A, & Bajwa AG. 2016. Endophyte Bioprospecting in South Asian Medicinal Plants: An Attractive Resource for Biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s00253-017-8115-x
- Trisharyanti I & Febriani R. 2017. Skrining Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Terhadap *Salmonella typhi* Resisten Kloramfenikol. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*.02: 66-77.