

Identifikasi Bakteri Endofit Pada Daun Sirih (*Piper betle* L.) Dengan Metode 16S rRNA

Identification of Endophytic Bacteria in Betel Leaves (Piper betle L.) Using the 16S rRNA Method

Eko Prasetya* & Joshua Leonard Damanik

Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Medan, Indonesia

Disubmit: 30 Januari 2025; Direview: 11 Februari 2025; Disetujui: 24 Maret 2025

*Corresponding Email: ekoprasetya.biologi@gmail.com

Abstrak

Daun sirih (*Piper betle* L.) adalah tanaman yang memiliki sifat antibakteri, dan merupakan salah satu tanaman yang dapat dijadikan sumber bakteri endofit. Bakteri endofit dapat menghasilkan metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inang. Dalam mengidentifikasi bakteri, digunakan gen 16S rRNA. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi spesies bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari daun sirih dengan metode 16S rRNA. Daun sirih yang diambil adalah daun tua. Metode yang digunakan adalah metode penelitian laboratorium dan studi literatur. Metode laboratorium yaitu isolasi dan identifikasi molekuler bakteri endofit. Metode studi literatur yaitu mencari hasil penelitian sebelumnya berupa jurnal, buku, artikel dan membandingkannya dengan hasil isolasi laboratorium yang didapat. Hasil identifikasi molekuler bakteri endofit memiliki kemiripan 99,81% dengan *Lysinibacillus fusiformis* strain N169 (IE 1), kemiripan 100% dengan *Pseudomonas aeruginosa* strain PaLo22 (IE 2), dan kemiripan 100% terhadap *Bacillus cereus* strain Z2-R9 (IE 3). Dapat disimpulkan bahwa terdapat 3 isolat endofit yang berhasil diisolasi dengan berbagai keragaman makroskopik dan mikroskopiknya,

Kata Kunci: Bakteri endofit; Gen 16s rRNA; Sirih

Abstract

*Betel leaf (Piper betle L.) is a plant that has antibacterial properties, and is one of the plants that can be used as a source of endophytic bacteria. Endophytic bacteria can produce the same secondary metabolites as the host plant. In identifying bacteria, the 16S rRNA gene is used. This study aims to identify endophytic bacterial species that were successfully isolated from betel leaves using the 16S rRNA method. The betel leaves taken are old leaves. The methods used are laboratory research methods and literature studies. Laboratory methods include isolation and molecular identification of endophytic bacteria. The literature study method is to look for previous research results in the form of journals, books, articles and compare them with the laboratory isolation results obtained. The results of molecular identification of endophytic bacteria have 99.81% similarity to *Lysinibacillus fusiformis* strain N169 (IE 1), 100% similarity to *Pseudomonas aeruginosa* strain PaLo22 (IE 2), and 100% similarity to *Bacillus cereus* strain Z2-R9 (IE 3). It can be concluded that there are 3 endophytic isolates that have been successfully isolated with various macroscopic and microscopic diversity.*

Keywords: Endophytic Bacteria; 16s Rrna Gene; Betel

How to Cite: Prasetya, E., & Damanik, J. (2025). Identifikasi Bakteri Endofit Pada Daun Sirih (*Piper betle* L.) Dengan Metode 16S rRNA. *Journal of Natural Sciences*. 6 (1): 1-8



PENDAHULUAN

Sirih Hijau (*Piper betle* L.) merupakan tanaman yang banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional, dan salah satu kategori tanaman merambat yang tergolong dalam keluarga Piperaceae. Daun sirih yang berwarna hijau memiliki kandungan senyawa tannin yang berfungsi sebagai antimikroba dan antijamur yang efektif serta mampu menghalangi perkembangan beberapa jenis bakteri. Selain itu, tanaman ini juga tersebar di berbagai kawasan global, seperti Sri Lanka, India, Malaysia, Filipina, dan bagian Timur Afrika (Arambewela *et al.*, 2005).

Tanaman sirih menjadi salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai sumber endofit. Daun tanaman sirih mengandung senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, karbohidrat, asam amino, steroid, tanin, dan terpen (yang mencakup cineole, cadinene, camphene, caryophyllene, limonene, pinene, Chavicol, ally pyrocatechol, carvacrol, safrole, eugenol dan chavibetol) (Pradhan *et al.*, 2013). Daun sirih berfungsi sebagai zat anti inflamasi, pembersih kuman, penghalau bakteri, penghenti aliran darah, pengurangi batuk, pelancar gas, pendorong produksi air liur, penangkal cacing, penghilang rasa gatal, serta memberikan efek menenangkan (Rahmawati *et al.*, 2020). Daun sirih dikenal memiliki kemampuan antibakteri yang berasal dari berbagai senyawa aktif yang mampu menghambat dan membunuh pertumbuhan bakteri baik Gram positif maupun Gram negatif. (Nouri *et al.*, 2014).

Mikroorganisme merupakan organisme kosmopolitan, artinya dapat ditemukan di mana saja dan berlimpah, salah satunya adalah bakteri, dimana kelimpahan bakteri dan fakta bahwa mereka dapat ditemukan di semua tempat tidak menutup kemungkinan bahwa masih banyak spesies bakteri yang belum sepenuhnya diidentifikasi (Simarmata *et al.*, 2007). Salah satu tempat di mana bakteri dapat ditemukan adalah di jaringan tanaman, seperti akar, batang, daun dan buah (Simarmata *et al.*, 2007);(Bacon & Hinton, 2006).

Bakteri endofit diketahui mampu menghasilkan metabolit sekunder akibat adanya pemindahan gen dari tumbuhan inang ke bakteri endofit, yang memungkinkan bakteri endofit untuk memproduksi metabolit sekunder yang serupa dengan yang dihasilkan oleh tumbuhan inangnya. Hal ini membuka peluang yang signifikan untuk mengisolasi metabolit sekunder hanya dengan mengambil sampel bakteri endofit dari tumbuhan inangnya. (Radji, 2005).



Potensi endofit tersebut menjadi peluang yang besar untuk mengeksplorasi berbagai jenis endofit dalam jaringan tanaman, khususnya pada tanaman sirih. Penelitian mengenai penemuan serta pemanfaatan endofit potensial pada daun tanaman sirih belum banyak diperhatikan. Oleh karena itu diperlukan eksplorasi bakteri endofit yang ada pada daun tanaman sirih, identifikasi bakteri endofit tersebut untuk mengetahui jenisnya, serta potensinya sebagai antibakteri. Saat ini, teknik identifikasi mikroorganisme semakin berkembang. Dengan perkembangan tersebut, Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan menganalisis molekuler isolat endofit tersebut menggunakan gen 16S rRNA (Rau *et al.*, 2018).

Berdasarkan latar belakang ini, dapat menjadi peluang besar untuk mengisolasi bakteri endofit pada jaringan daun sirih, terutama penelitian tentang potensi bakteri endofit pada daun sirih dan penggunaannya belum banyak dilakukan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui spesies bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari daun sirih (*Piper betle* L.) yang memiliki potensi antibakteri.

METODE PENELITIAN

Isolasi bakteri endofit

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi serta Laboratorium Biologi molekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Medan pada bulan Maret-Juni 2024. Sampel penelitian ini menggunakan Daun Tua tanaman sirih seberat 1 gram. Sampel daun sirih kemudian Dibilas menggunakan air yang mengalir hingga bersih dari segala kotoran. Proses sterilisasi pada permukaan daun dilakukan dengan merendamnya dalam alkohol 70% selama satu menit, kemudian direndam dalam kloroks 3% selama dua menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali. Selanjutnya, daun dikeringkan dan dihaluskan menggunakan alat tumbuk yang steril, lalu dipindahkan ke dalam 9 mL aquades steril. Dari hasil penggilingan, diambil 1 mL untuk dilakukan pengenceran dengan seri 10⁻¹ hingga 10⁻⁴, kemudian dari setiap seri pengenceran diambil 100 µL, yang kemudian dilarutkan ke dalam cawan petri berisi media TSA, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 hingga 48 jam. Untuk memastikan bahwa pekerjaan steril atau tidak, air bilas berair terakhir dituangkan ke permukaan media TSA (Zinniel *et al.*, 2002)

Identifikasi makroskopis dan mikroskopis

Pengamatan makroskopis terlihat bentuk koloni (dilihat dari atas): berbentuk titik, bulat, berserat, tidak beraturan, spiral. Permukaan koloni (dilihat dari samping): rata, melengkung, berbukit, berbentuk seperti kawah. Tepi koloni (dilihat dari atas): utuh, berombak, terpisah, bergerigi, berserat, dan melengkung. Warna koloni: putih, abu-abu, kuning, atau hampir transparan (Sartika *et al.*, 2022).

Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan gram. Pewarna yang digunakan adalah kristal violet dan safranin. (spiral) (Nurhidayati *et al.*, 2015).

Identifikasi molekuler isolat endofit terpilih

Isolat bakteri endofit yang dipilih diidentifikasi secara molekuler memakai gen penanda 16S rRNA. Untuk isolasi DNA menggunakan Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit. Proses amplifikasi menggunakan sekuen primer 16S rRNA Forward (5'-CCAGCAGCCGCGTAATAACG-3'), dan primer, 16S rRNA Reverse (5'-ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC-3') dan proses PCR (Polymerase Chain Reaction) menggunakan mesin Sensequest. Kondisi amplifikasi fragmen DNA pre-denaturasi dilakukan pada suhu 97°C selama 5 menit, kemudian dilanjutkan dengan 40 siklus melalui kondisi reaksi denaturasi di 94°C selama 5 menit, langkah annealing pada 52°C, dan ekstensi primer pada suhu 72°C selama 1 menit, diakhiri dengan proses PCR pasca-ekstensi pada suhu 72°C selama 10 menit (Kalghatgi *et al.*, 2008). Kemudian, produk PCR kemudian akan dikirim ke PT Genetika Sains untuk diurutkan. Setelah diperoleh hasil sequencing, analisis kesamaan data hasil urutan dengan bank data yang tersedia memanfaatkan perangkat lunak BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yang dapat diakses melalui situs web daring (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Studi Literatur

Setelah hasil identifikasi molekuler bakteri endofit didapatkan, kemudian membandingkan hasil yang didapat dengan hasil penelitian endofit daun sirih yang lain dengan mengumpulkan dan membandingkan informasi dari artikel yang melakukan identifikasi bakteri endofit pada tanaman sirih. Semua artikel ilmiah yang dijadikan referensi bersumber dari database NCBI dan *Google Scholar*.



HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi makroskopis dan mikroskopis

Melalui hasil isolasi diperoleh 3 koloni isolat yang tumbuh pada beberapa cawan petri dengan karakteristik makroskopis yang berbeda. Koloni bakteri endofit daun sirih dikarakterisasi secara makroskopik bertujuan untuk memperlihatkan keragaman dari bentuk, elevasi, pinggir, dan warna. Karakteristik makroskopis dari setiap isolat endofit disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik makroskopis koloni isolat endofit daun sirih

Kode Isolat	Bentuk	Elevasi	Pinggir	Warna
IE 1	Tak teratur	Rata	Rata	Cream
IE 2	Tak teratur	Rata	Rata	Cream
IE 3	Tak teratur	Rata	Rata	Putih

Banyaknya koloni yang didapat berbeda dengan penelitian sebelumnya, dimana Sagita dkk, (2017) berhasil mengisolasi 13 isolat endofit pada daun sirih hijau. (Sagita *et al.*, 2017) berhasil mengisolasi 13 isolat endofit pada daun sirih hijau dengan karakter makroskopik yang berbeda. (Sartika *et al.*, 2023) juga berhasil mengisolasi 3 isolat endofit dari daun sirih hijau, serta (Sartika *et al.*, 2022) yang berhasil mengisolasi 3 isolat endofit dari daun sirih hutan. Beragamnya ciri makroskopik isolat endofit ini kemungkinan karena media pertumbuhan yang digunakan. Hal ini sejalan dengan pernyataan yang diungkapkan oleh Bacon & Hinton, (2006) yang menyatakan bahwa jumlah bakteri endofit yang ada dalam tanaman tidak dapat diukur dengan tepat. Namun, bakteri endofit tersebut bisa ditemukan dengan cara mengisolasinya di media agar.

Pengamatan mikroskopis pada isolat endofit daun sirih dilaksanakan dengan menggunakan teknik pewarnaan gram. Pewarnaan gram bertujuan untuk mengenali gram pada bakteri endofit. Hasil pengamatan mikroskopis dari delapan isolat endofit daun sirih dapat dilihat pada Tabel 2

Tabel 2. Karakteristik mikroskopis isolat endofit daun sirih

Kode Isolat	Bentuk Sel	Warna	Gram
IE 1	Batang	Ungu	(+)
IE 2	Batang	Merah	(-)
IE 3	Batang	Ungu	(+)

Melalui hasil pewarnaan gram, dapat dilihat pada Tabel 2 menunjukkan isolat endofit IE 1, dan IE 3 bewarna ungu dan berbentuk batang/basil yang dapat dikategorikan bahwasanya kedua isolat endofit daun sirih tersebut merupakan bakteri gram positif. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian yang didapatkan Saputra *et al.*, (2015) yang



menunjukkan bahwasanya ciri mikroskopik bakteri bewarna ungu dan berbentuk batang dikategorikan bakteri basil gram positif. Pada Tabel 2, juga terdapat isolat endofit IE 2, bewarna merah dan berbentuk batang/basil, hal ini sejalan dengan studi Suyono & Salahudin, (2012) yang mengungkapkan bahwa bakteri dengan ciri mikroskopis bakteri bewarna merah dan berbentuk batang dikategorikan bakteri basil gram negatif.

Identifikasi molekuler

Identifikasi secara molekuler dilakukan pada isolat endofit menggunakan DNA sebagai daerah yang diamati, dimana bagian DNA yang umumnya digunakan untuk mengidentifikasi bakteri adalah pada fragmen 16S rRNA (Pangastuti, 2006). Melalui hasil identifikasi molekuler dengan BLAST, didapatkan hasil di tabel berikut.

Tabel 3. Tabel hasil analisis BLAST isolat IE 1

Description	Query Cover	Max Score	Total Score	Perc. Identify
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain N169 (JQ900510.1)	99%	944	944	99,81%
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain Y 38 (OQ911579.1)	99%	944	944	99,81%
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain GEM (KT369861.1)	99%	944	944	99,81%
<i>Lysinibacillus borointolerans</i> strain 22552 (OR436978.1)	99%	944	944	99,81%
<i>Lysinibacillus borointolerans</i> strain MH2 (MT742665.1)	99%	944	944	99,81%

Tabel 4. Tabel hasil analisis BLAST isolat IE 2

Description	Query Cover	Max Score	Total Score	Perc. Identify
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PaLo22 (CP075830.1)	100%	966	3867	100.00%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain 136790 (CP139424.1)	100%	966	3867	100.00%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain 192 (KM689187.1)	100%	966	966	100.00%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain NIOPAM1 (KC954482.1)	100%	966	966	100.00%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain Ps A0001 (OQ704181.1)	100%	966	966	100.00%

Tabel 5. Tabel hasil analisis BLAST isolat IE 3

Description	Query Cover	Max Score	Total Score	Perc. Identify
<i>Bacillus cereus</i> strain Z2-R9(JX994144.1)	100%	355	355	100.00%
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077 (MK377087.1)	100%	355	355	100.00%
<i>Bacillus bombysepticus</i> strain BC10 (OM214557.1)	100%	355	355	100.00%
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain 2G2 (KX576501.1)	100%	355	355	100.00%
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain T7F4_4 (MZ222264.1)	100%	355	355	100.00%

Terdapat beberapa informasi pada tabel di atas, yaitu *Query Cover* menunjukkan persentase seberapa panjang kesesuaian sekuens yang dimasukkan dengan urutan DNA sasaran. Apabila urutan DNA yang dimasukkan mencakup keseluruhan urutan DNA sasaran yang terdapat di database NCBI, maka persentase tersebut adalah 100%. Max



score menunjukkan nilai yang dihasilkan dari pencocokan antara urutan yang dimasukkan dengan urutan yang ada di database. Nilai tersebut didapat dari perhitungan matriks, yang merupakan matriks substitusi (substitution matrix).

Total Score menunjukkan nilai yang didapat dari seluruh pencocokan antara urutan input dan urutan yang ada dalam basis data yang sejalan. Nilai ini bisa berbeda dengan nilai max score jika terdapat lebih dari satu pensejajaran yang terdapat. Percentage Identity menunjukkan persentase kemiripan sekuens masukan dengan sekuens database NCBI (Kholishah *et al.*, 2022).

Melalui tabel di atas, dapat dilihat bahwa Isolat IE 1 memiliki kekerabatan dekat dengan *Lysinibacillus fusiformis* strain N169, Isolat IE 2 memiliki kekerabatan dekat dengan *Pseudomonas aeruginosa* strain PaLo22, dan Isolat IE 3 memiliki kekerabatan dekat dengan *Bacillus cereus* strain Z2-R9.

Melalui hasil identifikasi molekuler melalui BLAST yang didapatkan, dapat dibandingkan dengan hasil penelitian dari Sartika (2023), didapatkan isolat endofit MH yang berkerabat dekat dengan *Bacillus siamensis* strain cqsM9, dan dari penelitian Sartika (2022), didapatkan isolat endofit DM yang berkerabat dekat dengan *Bacillus thuringiensis* strain S38.

SIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengidentifikasi tiga spesies bakteri endofit dari daun sirih dengan metode 16S rRNA, yaitu *Lysinibacillus fusiformis* strain N169, *Pseudomonas aeruginosa* strain PaLo22, dan *Bacillus cereus* strain Z2-R9. Hasil ini menunjukkan bahwa daun sirih dapat menjadi sumber bakteri endofit dengan potensi bioaktif yang dapat diteliti lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

- Arambewela, L., Kumaratunga, K. G. A., & Dias, K. (2005). Studies on Piper betle of Sri Lanka. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 33(2), 133-139. <https://doi.org/10.4038/jnsfsr.v33i2.2343>
- Bacon, C. W., & Hinton, D. M. (2006). Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility. In *Plant-Associated Bacteria* (Issue 1992). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_5
- Kholishah, S. N., Wijayanti, D. P., & Sibero, M. T. (2022). Isolasi, Identifikasi dan Karakteristik Antimicrobial Resistance *Staphylococcus cohnii* Dari Perairan Semarang. *Jurnal Biology Education Science & Technology*, 5(1), 127-133.
- Nouri, L., Mohammadi Nafchi, A., & Karim, A. A. (2014). Phytochemical, antioxidant, antibacterial, and α -amylase inhibitory properties of different extracts from betel leaves. *Industrial Crops and Products*, 62, 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.015>
- Nurhidayati, S., Faturrahman, & Ghazali, M. (2015). Deteksi Bakteri Patogen yang Berasosiasi dengan *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Bergejala Penyakit Ice-Ice. *Jurnal Sains Teknologi Dan Lingkungan*, 1(2), 24-30. <https://doi.org/https://doi.org/10.29303/jstl.v1i2.53>



- Pangastuti, A. (2006). R E V I E W: Species definition of procaryotes based on 16S rRNA and protein coding genes sequence. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 7(3), 292–296. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d070319>
- Pradhan, D., Suri, K. a, Pradhan, D. K., & Biswasroy, P. (2013). Golden Heart of the Nature : Piper betle L . *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6), 147–167.
- Radji, M. (2005). Peranan Bioteknologi Dan Mikroba Endofit Dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2(3), 113–126. <https://doi.org/10.7454/psr.v2i3.3388>
- Rahmawati, N., Mujahid, R., & Widiyastuti, Y. (2020). Budidaya dan Manfaat Sirih untuk Kesehatan. In *Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI*.
- Rau, C. H., Yudistira, A., & Simbala, H. E. I. (2018). Isolasi, Identifikasi Secara Molekuler Menggunakan Gen 16S rRNA, Dan Uji Aktivitas Antibakteri Bakteri Symbion Endofit Yang Diisolasi Dari Alga Halimeda opuntia. *Pharmacon*, 7(2), 53–61. <https://doi.org/10.35799/pha.7.2018.19509>
- Sagita, D., Netty, S., & Azizah, N. (2017). Isolasi Bakteri Endofit Dari Daun Sirih (*Piper betle* L.) Sebagai Antibakteri Terhadap *Escherichia coli* Dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ipteks Terapan*, 11(1), 65. <https://doi.org/10.22216/jit.2017.v11i1.459>
- Saputra, R., Arwiyanto, T., & Wibowo, A. (2015). Uji aktivitas antagonistik beberapa isolat *Bacillus spp.* terhadap penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada beberapa varietas tomat dan identifikasinya. 1(118996), 1116–1122. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m010525>
- Sartika, D., Nessa, Afrianti, R., & Salsabil, R. (2022). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Endofit Daun Sirih Hutan Dengan Menggunakan Gen 16S rRNA. 7(2), 336–350.
- Sartika, D., Novelni, R., & Alena, M. (2023). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Endofit Dari Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Dengan Menggunakan Gen 16S rRNA Serta Uji Aktivitas Antibakterinya. *Jurnal Kesehatan Medika Sainatika*, 14(2), 394–405.
- 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(1), 85–90. <https://doi.org/10.23869/bphjbr.13.1.200714>
- Suyono, Y., & Salahudin, F. (2012). Identifikasi Dan Karakterisasi Bakteri *Pseudomonas* Pada Tanah Yang Terindikasi Terkontaminasi Logam. *Jurnal BIOPROPAL INDUSTRI*, 13(01), 8–13.
- Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R. G., & Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2198–2208. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2198-2208.2002>

