

Analisis Molekuler Bakteri Endofit SH 14 dari Mangrove *Scyphiphora hydrophyllacea* Pantai Rendani

Molecular Analysis of SH 14 Endophytic Bacteria from *Scyphiphora hydrophyllacea* Mangroves at Rendani Beach

Fallen Yamco¹⁾, Maria Massora¹⁾, Rina A Moge¹⁾, Reymas M.R. Ruimassa²⁾, Rinondom A.R.Moge³⁾

- ¹⁾ Program Studi Magister Biologi, Program Pascasarjana Universitas Papua.
Jl. Gunung Salju Amban Manokwari, Papua Barat, Indonesia, 98314
- ²⁾ Program Studi Magister Ilmu Pertanian, Program Pascasarjana Universitas Papua
Jl. Gunung Salju Amban Manokwari, Papua Barat, Indonesia, 98314
- ³⁾ Prodi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian UTSU
Jl. Piere Tendean Kompleks Megasmart 6 No 12 Manado Sulut

Email: r.moge@unipa.ac.id

Disubmit: 06 Februari 2024, direvisi: 29 Juni 2024, diterima: 30 Juni 2024

Doi : 10.30862/cassowary.cs.v7.i2.284

ABSTRACT: *The mangrove endophytic bacterial isolate Scyphiphora hydrophyllacea has antimicrobial capabilities and also has other bioactive compounds to be developed in the field of biotechnology. The aim of this study was to identify the endophytic bacterial isolate SH 14 obtained from the S. hydrophyllacea mangrove based on 16S rDNA sequence analysis. Molecular-based identification of bacteria, namely DNA amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers 27F and 1492R and has a gene amplification of 1481 bp. Sequence data analyzed using the BLAST program showed that isolate SH 14 had a homology level of 99.43% with Brevibacillus brevis. This similarity value is a reference in determining bacterial identification, where bacteria are categorized as the same species if they have a similarity of 99%.*

Keywords: *Scyphiphora hydrophyllacea* , bakteri endofit, *Brevibacillus brevis*, sekuensing, Rendani

PENDAHULUAN

Mangrove merupakan tumbuhan yang tumbuh di pantai atau dipinggiran sungai yang dapat menyesuaikan tempat hidupnya. Mangrove mempunyai fungsi yang beragam atau disebut ekologis dari berbagai habitat organisme laut, juga memiliki nilai penting,

dan kontribusinya terhadap alam berperan dalam lestarnya alam dan aktivitas manusia. Mangrove juga berperan sebagai pelindung pantai dari bencana alam, penyerap karbon dan mencegah masuknya air laut ke darat. Mangrove juga dikatakan sebagai *nursery ground* yaitu tempat asuhan, bertelur dan

sumber pakan dari berbagai organisme marin seperti ikan, fungsi lain sebagai sumber penghasil pangan, ramuan obatan, biomassa, bahan papan yang menjadi sumber usaha bagi masyarakat sekitar serta sebagai lokasi wisata. (Susanto *et al.*, 2022)

Penelitian Avesina dan Dewi (2021) menyatakan beberapa spesies mangrove dipakai sebagai bahan produksi membuat pestisida alami dan insektisida. Menurut Aphrodita *et al* (2022) ada sejumlah spesies mangrove yang bisa diekstrak untuk memperoleh senyawa antibiotik terutama terhadap bakteri patogen seperti *Staphylococcus* sp. dan *Shigella* sp, disamping itu mangrove mempunyai komponen bioaktif yang dapat menghalangi pertumbuhan bakteri penyebab penyakit pada manusia.

Bakteri endofit adalah bakteri yang terdapat di jaringan pada tanaman dan tidak akan membahayakan inangnya. Bakteri endofit juga memproduksi komponen bioaktif berupa antioksidan, antimikroba, antikanker, anti HIV, dan sebagainya. Keunggulan bakteri endofit memproduksi senyawa bioaktif yang sama dengan tanaman inangnya adalah peluang yang bisa dipakai untuk mencari sumber obat baru. Hal ini dapat dilakukan karena bakteri mudah ditumbuhkan, juga siklus hidupnya yang pendek dan serta memproduksi sejumlah komponen bioaktif dalam skala besar dengan metode fermentasi. Bakteri endofit pada jaringan tanaman bisa mendorong pertumbuhan tanaman juga untuk media pengendalian hayati, karena dapat melakukan penetrasi terhadap organisme pengganggu. Setelah penetrasi maka bakteri tersebut akan berkoloni dan menghambat perkembangan bakteri patogen. (Handayani, *et al.*, 2023).

Sejumlah bakteri endofit yang bersimbiosis dengan mangrove yang memiliki kemampuan untuk menghambat mikroba patogen *Salmonella typhi* dan *Shaphylococcus aureus* (Ramadhanty, *et al.*,

2021). Penelitian Amir (2022) menemukan empat isolat adalah SH1, SH2, SH7 dan SH 14 yang memiliki kemampuan menghambat bakteri patogen uji *E coli* dan *S aureus*, dari empat isolat tersebut isolat SH 14 sangat potensial untuk dikembangkan sebagai *effective microorganism*. Dengan kemajuan teknologi saat ini maka identifikasi secara genotif lebih banyak digunakan dimana melibatkan DNA dari bakteri. Suatu isolat bakteri dapat diidentifikasi sampai pada tingkat genus dan spesies melalui amplifikasi dan sekuensing 16S rDNA. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi isolat bakteri endofit yang diperoleh dari Mangrove *Scyphiphora hydrophyllace* berdasarkan analisis sekuen 16S rDNA.

METODE PENELITIAN

1. Peremajaan Bakteri Endofit

Bakteri endofit yang dipakai berasal dari penelitian Amir (2022), isolat bakteri SH 14 ditanam kembali pada media Marine Agar kemudian dipindahkan dalam cawan petri setelah tumbuh dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi Marine Agar miring.

2. Kultur Isolat Bakteri untuk isolasi DNA Genom

Isolat SH 14 bakteri disimpan sebagai biakan stok dalam media cair gliserol 12% pada suhu 4°C. Isolat dikultur terlebih dahulu pada media Marine Agar miring. Kultur isolat bakteri tersebut selanjutnya diisolasi DNA genomnya.

3. Penapisan DNA dari Isolat Bakteri Endofit

Tahapan penapisan atau isolasi DNA dari isolat bakteri endofit dilakukan melalui protocol Zymo-Spin kit. Isolat bakteri dikultur pada media Marine Agar. Bakteri kultur lalu diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam. Diambil kultur bakteri sebanyak 6-8 ose dipindahkan ke tube microcentrifuge yang berisi 200 µl akuabides (ddH₂O) lalu divortex selama 1 menit. Suspensi sebanyak

200 µL diambil dan dimasukkan ke dalam tabung lisis (*ZR BashingBeadTM Lysis Tube*), ditambahkan 750 µL *BashingBeadTM Buffer* ke dalam *tube* tersebut. Kemudian di-vortex selama 20 menit. Dilanjutkan sentrifugasi 10.000 xg, selama semenit. Lalu diambil supernatan sebanyak 400 µL diambil dan dimasukkan dalam filter (*Zymo-SpinTM III-F Filter*) yang sudah ditambah *collection tube* di bagian bawah filter. Kemudian sentrifugasi pada 8.000 xg selama 1 menit. Lalu ditambahkan 1.200 µL *Genomic Lysis Buffer* ke dalam filtrat dalam *collection tube*. Diambil sekitar 800 µL dan dimasukkan pada kolom (*Zymo-SpinTM IICR Column*) yang sudah terdapat *collection tube* baru. Kemudian di sentrifugasi 10.000 xg semenit. Cairan di *collection tube* dibuang dan tahap sebelumnya diulangi lagi. Lalu diambil sebanyak 200 µL *DNA Pre-Wash Buffer* ditambahkan ke *Zymo-SpinTM IICR Column* di *collection tube* baru dan disentrifugasi 10.000 xg semenit. Sekitar 500 µL *g-DNA Wash Buffer* ditambahkan ke *Zymo-SpinTM IICR Column* dan disentrifugasi pada 10.000 xg selama 1 menit. *Zymo-SpinTM IICR Column* dipindahkan ke tabung *microtube* 1.5 mL steril baru dan ditambahkan 100 µL (minimal 35 µL) *DNA Elution Buffer* ke matriks kolom. Kemudian sentrifugasi pada 10.000 xg selama 30 detik untuk mengeluarkan DNA.

4. Analisis DNA menggunakan Elektroforesis

Dalam menganalisis DNA memakai gel agarose 1 % dalam elektroforesi. Cara membuat Gel agarose ini yaitu timbang serbuk agarosa sekitar 0,5 g serta dilarutkan pada 50 ml buffer TAE 1x. Cairan agarosa ditangaskan dan dituangkan pada pencetak gel dengan suhu sekitar 60 °C, dan sisi lain diletakkan pada dekat tepian gel dan kemudian didiamkan mengeras lalu sisi diangkat dan setelahnya gel agarosa dimasukkan ke dalam chamber elektroforosis

yang berisi buffer TAE 1x yang mana akan merendam gel agarosanya.

Langkah berikut DNA diambil sekitar 10 µl dimasukkan loading dye sekitar 2 µl dan dihomogenkan. Hasil campurannya dipipet ke sumur gel agarosa, juga sumur lain dimasukan mix 2 µl DNA ladder 1 kb, dan loading dye 6x sekitar 2 µl dan 8 µl ddH₂O. Elektroforesisnya dihidupkan dan tegangannya disetel 100 volt dengan waktu 45 menit. Proses elektroforesis berakhir maka gel agarose diangkat lalu dipindahkan ke tempat lain yang ada larutan etidium bromide sekitar 15 menit di wadah gelap, lalu dicuci dengan akuades. Hasil yang diperoleh lalu diamati dengan UV transilluminator, dan terlihat ada pita DNA membuktikan hasilnya positif lalu difoto untuk dokumentasi.

5. Amplifikasi Sekuan 16S rDNA dari DNA Genom

Amplifikasi sekuan 16S rDNA memakai primer *forward* 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan primer *reverse* 1492r (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'), primer ini adalah primer universal bagi beragam strain bakteri. Primer tersebut didesain berdasarkan sekuan yang terkonservasi pada ujung 5' dan 3' gen 16S rDNA bakteri, sehingga dapat mengamplifikasi hampir keseluruhan gen (Tian, *et al.*, 2022).

Campuran reaksi yang digunakan dalam amplifikasi sekuan 16S rDNA disajikan pada Tabel 1. Campuran reaksi tersebut disentrifugasi sebentar sebelum dimasukan dalam mesin PCR dengan program tertentu.

Amplifikasi sekuan 16S rDNA dilakukan dengan menggunakan *PCR Mastercycler Gradient* (Eppendorf) yang telah diprogram. Program untuk amplifikasi 16S rDNA tersebut disajikan dalam Tabel 2.

Visualisasinya dari hasil amplifikasi 16S rDNA pada elektroforesis berada di gel agarose 1% dengan pewarnaan *ethidium bromide*. Elektroforesisnya dibuat pada

tegangan 50 V sekitar 30 menit. Hasil amplifikasi tersebut selanjutnya digunakan

untuk analisis sekuensing disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 1. Campuran Reaksi untuk Amplifikasi Sekuan 16S rDNA

No.	Reaksi	Suhu (°C)	Waktu (menit)
1	Denaturasi awal	94	5
2	35 siklus : Denaturasi	94	1
	<i>Annealing</i>	54	30 detik
	Ekstensi	72	1
3	Ekstensi akhir	72	1

Tabel 2. Program untuk Ampifikasi Sekuan 16S rDNA

No.	Larutan	Volume (µL)	Konsentrasi
1	<i>PCR mix master</i>	25	
2	Primer forward (27f)	2	30 pmol/µL
3	Primer reverse (1492r)	2	30 pmol/µL
4	DNA <i>template</i> F5	2	1 µmol/µL
5	Akuabides bebas nuclease	19	

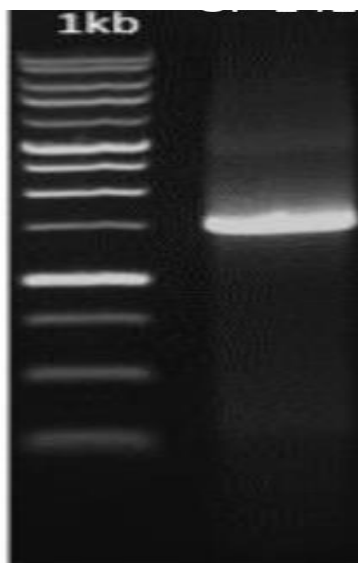
Hasil sekuensing gen 16S rDNA dianalisis menggunakan program Mega. Hasilnya dibandingkan dengan data yang terdapat pada Gen Bank memakai program Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

(<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Tahap selanjutnya karakterisasi dari BLAST disejajarkan dengan sekuen gen 16S rDNA bakteri berbeda di pangkal data yang sama dengan menggunakan program Mega dan dibuat pohon filogenik untuk mengetahui hubungan kekerabatan. Dalam mengkonstruksi pohon filogenik menggunakan analisa metode Neighbor-joining dengan model Kimura 2 parameter yang ada pada software MEGA X.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Molekuler

Setelah penggunaan *Polymerase chain reaction* (PCR) untuk mengekstraksi DNA dengan menggunakan tingkatan ukuran sekuensing *forward* primer 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan sekuensing primer *reverse* 1492r (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') dan hasil sekuensing dengan 16S rRNA mampu mengamplifikasi gen sepanjang 1481 bp. (Tian *et al*, 2022). Hasil dari proses amplifikasi digunakan dalam tahap sekuensing DNA. Data *forward* primer dan *reverse* primer berupa DNA yang telah teramplifikasi dari proses PCR kemudian dielektroforesis untuk menentukan kualitas dari isolat SH 14.



Gambar 1. Hasil amplifikasi PCR DNA bakteri endofit SH 14

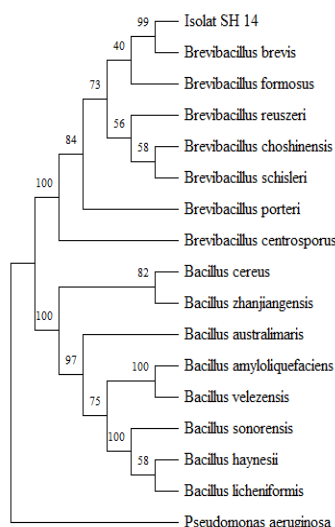
Hasil visualisasi penelitian ini menunjukkan bahwa pita DNA isolat SH 14 berada pada molekul fragmen sekitar 1500 bp, ukuran nukleotida yang mencapai 1500

bp menandakan bahwa pasangan primer yang digunakan berhasil mengamplifikasi daerah 16S rDNA secara keseluruhan dan dapat digunakan dalam identifikasi bakteri.

Tabel 3. Hasil Blast DNA bakteri endofit SH 14

Spesies	Max score	Total Score	Query cover	E value	Percent ident
<i>Brevibacillus brevis</i> strain GE12	2542	2542	100%	0,0	99,43 %

Berdasarkan Tabel 3, hasil homologinya teridentifikasi bakteri endofit SH 14 yaitu 99,43 % adalah *Brevibacillus brevis* strain GE12.



Gambar 2. Pohon Filogenik Model Neighbord Joining

Pohon filogenik menunjukkan bahwa analisis pohon filogenetik dilakukan dengan program Mega X dengan metode *Neighbour Joining Tree*, model kimura 2-parameter, dan 1000 kali ulang pohon consensus bootstrap untuk mewakili sejarah evolusi taksa yang dianalisis (Tamura *et al.*, 2021).

Proses analisis pohon filogenetik melibatkan 16 urutan nukleotida dari *Bacillus* dan bakteri gram positif lainnya. Berdasarkan hasil analisis yang ditentukan dengan pohon filogenetik yang ditunjukkan pada Gambar 2, Isolat SH 14 memiliki tingkat kemiripan dengan sekuen *Brevibacillus brevis*. *Brevibacillus brevis* sebelumnya dikenal sebagai *Bacillus brevis*. *Bacillus brevis* adalah bakteri Gram positif, aerobik, motil, pembentuk spora, berbentuk batang yang biasa ditemukan di tanah, udara, air, dan bahan yang membusuk. *Brevibacillus brevis* juga disebut sebagai inang bakteri yang semakin banyak digunakan untuk mengekspresikan protein rekombinan karena kemampuan sekresinya yang sangat baik (Sattanathan, *et al.*, 2024).

Bacillus brevis pertama kali dikarakterisasi pada tahun 1900 dan merupakan taksonomi sebagai tipe spesies *Brevibacillus brevis* dari genus baru. Penggunaan pohon filogenik melibatkan lima belas spesies lainnya dan hasilnya mendekati bakteri *Brevibacillus brevis* awal penamaan diusulkan oleh Shida *et al.*, pada tahun 1996 (Yang, *et al.*, 2023). *Bacillus* menghasilkan metabolit sekunder yaitu bacillomycin dan locillomycin. Metabolit ini digunakan untuk

mengendalikan bakteri patogen. (Rakhmawatie, *et al.*, 2023).

Bacillus adalah salah satu genera terbesar, terdiri dari spesies yang berbeda. Mereka termasuk dalam famili Bacillaceae dan dibagi menjadi beberapa bagian yaitu meliputi *Bacillus polymyxa* sebagai perwakilan, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, dan strain *Brevibacillus brevis*, *B. badius*, dan *B. freudenreichii*, *B. sphaericus*, *B. insolitus*, *B. psychrophillus*, dan beberapa spesies lainnya. Spesies *Bacillus* beragam secara genotip dan fenotip (Niu, *et al.*, 2022). Spesies *Bacillus* memiliki kemampuan untuk berkoloni dan bertahan hidup di ekosistem yang berbeda. Spesies *Bacillus* ada di mana-mana dan menempati ekologi tanah, tanah liat, batu, debu, laut, udara, tumbuhan, dan hewan. *Bacillus* sebagai pembentuk spora, memiliki manfaat untuk bertahan hidup dan menjajah lingkungan yang berbeda (Rakhmawatie, *et al.*, 2023).

Brevibacillus brevis dapat dianggap menghasilkan Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) dan tersebar luas di tanah dan sedimen, dan telah banyak digunakan di bidang pertanian dan remediasi lingkungan karena berbagai potensi yang dimilikinya. Bakteri ini merupakan gram positif (Kim, *et al.*, 2023). Berdasarkan pengujian pada isolat SH 14 dengan menggunakan uji biokimia bakteri ini berbentuk batang, motil, berspora dan aerobik.

Klasifikasi ilmiah *Brevibacillus brevis*

Domain : Bakteri
Divisi : Bacillota
Kelas : Basil
Famili : Bacillales
Keluarga : Paenibacillaceae

KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh pada penelitian ini dari hasil identifikasi molekuler

Marga : *Brevibacillus*
Jenis : *Brevis*
Nama binomial : *Brevibacillus brevis*
(Yang, 2023)

dengan metode PCR diketahui bakteri *Brevibacillus brevis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Avesina M., & Y. S. K. Dewi., (2021). Efektivitas Ekstrak Metanol Kulit Batang *Sonneratia alba* sebagai Biopestisida Pengendali Spodoptera litura F. pada Tanaman Sawi Caisim (*Brassica juncea* L.). *Lanteria Bio*.10(1).10-16.
- Aphrodita A., Imeliyanti F., & D. Rahmadhani., (2022). Potensi Antimikroba pada Tanaman Mangrove di Indonesia terhadap *Staphylococcus* sp. Dan *Shigella* sp. *KELUWIH: Jurnal Sains dan Teknologi*, Vol.3(2), 101-108
- Amir S., (2022). Uji Aktivitas Antibakteri Isolat bakteri endofit asal daun Mangrove *Scyphiphor hydrophyllacea* . Skripsi. Universitas Papua.
- Handayani N., A. Sabdaningsih., O. E. Jati., & D. Ayuningrumi., (2023). Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Endofit Dari Akar *Avicennia Marina* Di Kawasan Mangrove Pantai Tirang, Semarang. *Jurnal Pasir Laut* .7 (2) : 68-73.
- Kim. H., Y. Lee., Ye-Ji Hwang., Mi-Hwa Lee., K. Balaraju., & Y. Jeon., (2023). Identification and characterization of *Brevibacillus halotolerans* B-4359: a potential antagonistic bacterium against red pepper anthracnose in Korea. *Frontiers in Microbiology* (14)1-15.
- Niu M., H. Ming., Li-jiao Cheng., Bing-fang Yi., Ting-ting Xia., Meng Li., & Guo-Xing Nie1., (2020). *Brevibacillus migulae* sp. nov., isolated from a Yellow River sediment sample. *International Journal Systematic. Evolutionary Microbiology*. 70:5693–5700
- Ramadhanty M. R., A. T Lunggari., & Nurhayati., (2021). Isolasi bakteri endofit asal tumbuhan mangrove *Avicennia marina* dan kemampuannya sebagai antimikroba patogen *Salmonella typhi* dan *Shaphyulococcus aureus* secara in vitro. *Niche Journal of Tropical Biology*. 4(1):16-22.
- Rakhmawatie M. D., N. Marfu'ati., B. Barsaliputri., A. Z. Fikriyah., S. N. Ethica., (2023). Antibacterial activity and GC-MS profile of secondary metabolites of *Bacillus subtilis* subsp.subtilis HSFI-9 associated with *Holothuria scabra*. *Jurnal Biodiversitas* 24(5):2843-2849.
- Sattanathan S., V. Sriraman., J. Jemina., M. Ranjani., A. Anurupa., M. Ramya., & P. Rathinasabapathi., (2024). Panchagavya-Derived *Brevibacillus brevis* S1-3: Insights from the Draft Genome on its Antimicrobial and Plant Growth-Promoting Ability. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 18(1):467-475.
- Susanto. A., M. A. Khalifa., E. Munandar., H. S Nurdin., H. Syafrie., F. N. Supadminingsih., A. N Hasanah., B. A. Meata., R. Irnawati., A. Rahmawat., A. N. Putra., T. Alansar., J. Saputra., B. I. Sulistyono., A. Raihan., (2022). Kondisi Kesehatan Ekosistem Mangrove Sebagai Sumber Potensial Pengembangan Ekonomi Kreatif Pesisir Selat Sunda. *Jurnal Agroekoteknologi*. 172-181.
- Tamura K., G. Stecher., S. Kumar., (2021). Mega 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol* 38(7):3022-3027.
- Tian., Jichen., Chong Chen., G. Lartey-Young., & L. Ma., (2022). Biodegradation of cefalexin by two bacteria strains from sewage sludge. *Royal Society Open Sceince*. 1-13.

Yang W., H. Yang., X. Bao., M. Hussain., Q. Bao., Z. Zeng., C. Xiao., L Zhouand., X Qin., (2023). *Brevibacillus*

brevis HNCS-1: a biocontrol bacterium against tea plant diseases. *Frontiers in Microbiology*. (14) 1-11.