

Identifikasi molekuler isolat bakteri endofit potensial antibakteri tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) berdasarkan gen 16S rDNA

Sekar Agustianingrum*, Ika Afifah Nugraheni, Arif Bimantara, Dinar Mindrati Fardhani

Program Studi Bioteknologi, Fakultas Sains & Teknologi, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta

Email : sekaragustianingrum@gmail.com; ikaafifah@unisayogya.ac.id

Abstrak

Bakteri endofit dikategorikan sebagai bakteri non-patogen yang hidup didalam jaringan tanaman. Bakteri endofit asal tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) kode isolat DA 1(4), BA 2(3), BA 3(1), dan BU 3(5) menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* dan *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil analisis filogenetik bakteri endofit potensial antibakteri asal tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) berdasarkan gen 16S rDNA. Penelitian ini diawali dengan melakukan isolasi DNA, DNA selanjutnya di amplifikasi menggunakan PCR, dilanjutkan sekuensing dengan metode *Oxford Nanopore Sequencing* kemudian hasil sekuensing dilakukan rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan software MEGA11 untuk mengetahui urutan kekerabatannya. Hasil penelitian yang telah dilakukan, bakteri endofit asal tanaman ciplukan kode DA 1(4) menunjukkan kekerabatan dengan *Kocuria palustris* strain HKG358, kode BA 2(3) dengan *Staphylococcus edaphicus* strain BPs2, kode BA 3(1) dengan *Bacillus subtilis* strain K6AP005, dan kode BU 3(5) dengan *Mikrokokus* sp. strain PSH12 yang semua menunjukkan kemiripan 100%.

Kata kunci: 16s rDNA; analisis filogenetik; bakteri endofit; identifikasi; *physalis angulata* l.

Molecular identification of potential antibacterial endophyte bacterial isolate of ciplukan (*Physalis angulata* L.) plant based on 16S rDNA gene

Abstract

Endophytic bacteria are categorized as non-pathogenic bacteria that live in plant tissue. Endophytic bacteria from the ciplukan plant (*Physalis angulata* L.) isolate codes DA 1(4), BA 2(3), BA 3(1), and BU 3(5) produce secondary metabolites which have antibacterial activity against the pathogenic bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa*, and *Staphylococcus aureus*. This study aims to determine the results of phylogenetic analysis of potential antibacterial endophytic bacteria from the ciplukan plant (*Physalis angulata* L.) based on the 16S rDNA gene. This research began by isolating DNA, then amplifying the DNA using PCR, followed by sequencing using the *Oxford Nanopore Sequencing* method, then reconstructing the phylogenetic tree using MEGA11 software to determine the relationship sequence. The results of the research that had been carried out exposed that the endophytic bacteria from the ciplukan plant, code DA 1(4), showed a relationship with *Kocuria palustris* strain HKG358, code BA 2(3) with *Staphylococcus edaphicus* strain BPs2, code BA 3(1) with *Bacillus subtilis* strain K6AP005, and code BU 3(5) with *Micrococcus* sp. PSH12 strains; all showed 100% similarity.

Keywords: 16s rDNA; endophytic bacteria; identification; *physalis angulata* l; phylogenetic analysis

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang memiliki sumber daya tanaman yang melimpah dan menjadi salah satu negara yang memiliki tanaman obat terbesar di dunia (Alqamari, 2017). Salah satu tanaman yang diketahui memiliki khasiat sebagai obat adalah tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.). Tanaman ciplukan memiliki beberapa kandung senyawa yang dimanfaatkan sebagai obat. Beberapa senyawa aktif dari tanaman ciplukan antara lain flavonoid, alkaloid, polifenol, tanin, saponin, dan steroid. Berdasar beberapa senyawa aktif yang terkandung pada tanaman ciplukan dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri, antioksidan, antiinflamasi, antidiabetes, dan imunostimulan (Rustikawati, 2021).

Pemanfaatan tanaman kini tidak terhenti pada bagian tanaman saja, Rustamova *et al* (2020) dalam penelitiannya menyatakan terdapat bakteri yang hidup bersimbiosis dengan tanaman yang disebut

dengan bakteri endofit. Hubungan simbiosis ini memungkinkan dugaan bahwa bakteri endofit memiliki aktivitas biologis yang sama dengan tumbuhan inangnya. Bakteri endofit dengan tanaman bersimbiosis mutualisme, dimana bakteri endofit diuntungkan dengan mendapatkan sumber nutrisi dari hasil metabolisme tanaman sedangkan tanaman menapatkan *derivate* nutrisi dan senyawa aktif yang diperlukan untuk proteksi dari bakteri patogen (Desriani *et al*, 2014).

Eksplorasi potensi bakteri endofit diperlukan studi lanjut seperti identifikasi molekuler. Identifikasi molekuler dapat dilakukan dengan melakukan skrining bakteri berdasar susunan basa DNA yang terdapat pada daerah 16S rDNA (Vetrovsky *et al*, 2013). 16S rDNA merupakan gen yang mengkode subunit kecil (16S rRNA) 16S dari ribosom prokariotik. Gen 16S rDNA memiliki panjang sekitar 1541 bp (Karst *et al*, 2018). Metode pengurutan menggunakan 16S secara umum dipercaya sebagai metode yang akurat dan terkarakterisasi dengan baik sehingga menggambarkan informasi yang cukup mengenai mikroba (Laudadido *et al*, 2018). Analisis 16S rDNA digunakan untuk mengetahui hubungan antar spesies apabila sekuen nukleotida dari gen 16S rDNA antara organisme mirip atau memiliki sedikit perbedaan, maka dilihat secara evolusinya kemungkinan dua organisme tersebut memiliki hubungan kedekatan (*common ancestor*). Kekerabatan tersebut nantinya dapat dikonstruksikan melalui analisis filogenetik (Darmayanti, 2011).

Analisis filogenetik diintegrasikan dengan data spasial untuk menarik kesimpulan evolusi makhluk hidup. Analisis filogenetik tidak akan terlepas dari proses evolusi yang menyertai siklus kehidupan makhluk hidup, hal ini karena keturunan akan memiliki perbedaan dari genetika nenek moyang. Analisis filogenetik menggunakan data molekuler seperti DNA atau protein yang diurutkan sehingga dapat diketahui hubungan evolusi antar spesies (Subari, 2021). Analisis filogenetik memiliki tujuan untuk menyusun hubungan filogenetik yang pada umumnya digambarkan dalam suatu garis bercabang-cabang seperti pohon sehingga sering disebut pohon filogenetik (Irawan, 2013).

Uji karakterisasi morfologi dan fisiologi pada bakteri untuk menunjukkan kemiripan antar genus memiliki presentase kebenaran yang rendah. Sehingga penting untuk melakukan pengujian bakteri endofit secara molekuler berdasarkan sekuen gen 16S rDNA untuk mengetahui kemiripan atau kekerabatan antar genus berdasarkan informasi basa DNA dari bakteri. Gen 16S menyandi gen yang konservatif yang memungkinkan menyimpan informasi genetika suatu bakteri yang masih lestari. Oleh karena itu, dengan penelitian ini diharapkan dapat mengetahui hasil analisis filogenetik dari bakteri endofit DA 1(4), BA 2(3), BA 3(1), dan BU 3(5) asal tanaman ciplukan.

2. Metode

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta dengan sampel isolat bakteri endofit potensial antibakteri tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) dari penelitian terdahulu yang telah dilakukan oleh Setianah *et al* (2020). Isolat bakteri endofit yang dipilih memiliki aktivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus* adalah bakteri endofit kode isolat DA 1(4), BA 2(3), BA 3(1), dan BU 3(5). Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain, isolat bakteri endofit tanaman ciplukan, media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), Kit isolasi DNA (Promega), *isopropanol*, *RNAse*, *DNA rehydration solution*, *Ethanol 70%*, *EDTA*, *Lysozyme*, *DNA Ladder*, *Go Taq Green Master Mix PCR*, *Primer Universal 16S 27 F 1492 R*, *Nuclease Free Water*, dan *Ethidium Bromida*.

2.1. Peremajaan Isolat Bakteri

Peremajaan bertujuan agar bakteri stock yang masih dalam keadaan dorman menjadi biakan yang segar sehingga saat bakteri digunakan dalam keadaan optimal. Media NA ditimbang sebanyak 5,6 gram kemudian dilarutkan dengan aquadest steril sebanyak 200 ml. Sterilisasi pada autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 – 20 menit. Selanjutnya inokulasikan isolate stock pada petri media steril dengan metode *streak plate* (goresan) membentuk 4 kuadran untuk mendapatkan koloni tunggal. Selanjutnya inkubasi pada suhu ruang selama 2 × 24 jam. Koloni tunggal yang telah didapatkan selanjutnya diinokulasikan pada media cair *Nutrient broth* (NB) untuk persiapan isolasi DNA bakteri. Inokulasi dilakukan dengan menyentuhkan permukaan ose bulat pada koloni tunggal yang telah didapatkan

kemudian pindahkan pada media NB. Inkubasi selama 2×24 jam pada suhu ruang dan letakkan pada *shaker* agar bakteri tumbuh merata pada media NB.

2.2. Isolasi DNA

Isolasi DNA sample isolat bakteri endofit asal tanaman ciplukan dilakukan berdasarkan prosedur *Wizard Genomic DNA Purification Kit instruction* A1120. Terdapat perbedaan perlakuan pada isolasi DNA menyesuaikan jenis bakteri gram. Hal ini berkaitan dengan susunan dinding sel bakteri. Pada sampel bakteri gram positif dilakukan penambahan EDTA dan enzim litik *Lysozyme* (10 mg/ml).

2.3. Amplifikasi

Pada penelitian ini proses amplifikasi sekuen 16S rDNA dilakukan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Prosedur PCR dilakukan menggunakan alat MultiGene OptiMax *Thermal Cycler* berdasarkan panduan standar aplikasi dengan penggunaan *MasterMix Gotaq Green* Promega (M7 122). Menggunakan Primer Universal 16S 27 F 5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3' dan 1492 R 5' – GGT TAC CTT GTT ACG ACCTT – 3' dengan campuran reaksi (Tabel 1) dan program PCR (Tabel 2) sebagai berikut :

Tabel 1. Komponen reaksi PCR MasterMix Gotaq Green Promega (M7 122)

Komponen	Volume (µl)
Gotaq Green MasterMix (M7 122)	12,5
Nuclease Free Water (NFW)	7,5
Forward primer	1
Reverse primer	1
Sampel DNA	3
Total	25

Tabel 2. Program PCR

Tahap	Suhu	Waktu
Denaturasi Awal	94 °C	3 Menit
Denaturasi	94 °C	1 Menit
Annealing	52 °C	1 Menit
Extention	74 °C	2 Menit
Final Extention	74 °C	10 Menit
Siklus		30

Hasil PCR selanjutnya dilakukan visualisasi untuk melihat panjang pita DNA dengan metode elektroforesis yang didasarkan pada penelitian (Kasi, 2019). Dibuat *gel agarose* 1,5% dengan mencampurkan 1,5 g media agarose kedalam 100 mL TAE buffer pada erlenmeyer. Dipanaskan pada *hotplate* sampai mendidih lalu ditambahkan 2 µl Ehidium Bromida dan homogenkan. Larutan gel didiamkan pada suhu kamar hingga suhu relatif hangat. Larutan gel dituangkan dalam cetakan gel elektroforesis menggunakan sisir gel. Dimasukkan masing-masing 5 µl produk hasil PCR dan *DNA Ladder* kedalam sumur *gel agarose* 1,5% yang direndam dalam tangki yang berisi TAE buffer. Elektroforesis dilakukan selama 50 menit dengan tegangan konstan sebesar 100 volt. Setelah 50 menit elektroforesis dihentikan kemudian gel diangkat untuk diamati dibawah sinar UV.

2.4. Sekuensing

Sampel hasil produk PCR dilakukan sekuensing melalui pihak ketiga PT. Genetika Science Indonesia dengan menggunakan metode *Oxford Nanophore Technologies* (ONT). Nanopori sekuensing merupakan teknologi yang memumpuni dan cepat untuk melakukan pembacaan panjang secara langsung (*Real-Time*) dengan biaya relatif rendah (Rang *et al*, 2018).

2.5. Analisis Filogenetik

Data hasil sekuensing sekuen 16S rDNA berbentuk AB1 file, data diolah menjadi data Fasta menggunakan software *Bioedit*. Selanjutnya lakukan pencarian sekuen referen yang dilakukan

menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) yang tersedia pada website NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. File sekuen dalam format Fasta pilih opsi “*blastn*” untuk melakukan pencarian sekuen berdasarkan “*nucleotide query*”. Database yang digunakan untuk pencarian adalah “*standar database*”. Program seleksi dioptimalkan untuk “*high similar sequence*” (Chen, 2015). File FASTA yang didapatkan dari hasil pencarian referen sekuen digunakan sebagai data utama untuk analisis filogenetik. Data sekuen disejajarkan dengan *ClustalW* pada Software MEGA 11.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Peremajaan Isolat Bakteri

Sampel isolat bakteri endofit dipilih berdasarkan potensinya sebagai antibiotik (daya hambat yang terbentuk) dan laju pertumbuhan yang optimal. Sampel dibiakkan pada media *Nutrient agar* (NA) diamati setiap 24 jam. Isolat dengan pertumbuhan optimal pada waktu 3×24 jam dan membentuk koloni tunggal diambil sebagai sampel. Adapun 4 sampel isolat bakteri endofit asal tanaman ciplukan yang digunakan pada penelitian ini antara lain:

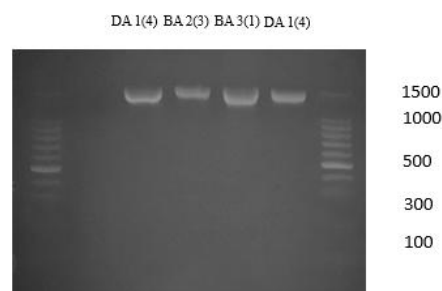
Tabel 3. Sampel isolat bakteri endofit tanaman ciplukan (Setianah *et al*, 2020)

No	Kode Bakteri	Pewarnaan Gram	Uji Antibakteri	Bakteri Patogen yang Dihambat Pertumbuhannya
1	DA1(4)	Positif (+)	Positif (+)	<i>Eschericia coli</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>
2	BA2(3)	Positif (+)	Positif (+)	<i>Pseudomonas aureginosa</i> , <i>Eschericia coli</i> , dan <i>Staphylococcus aureus</i>
3	BA3(1)	Negatif (-)	Positif (+)	<i>Pseudomonas aureginosa</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>
4	BU3(5)	Negatif (-)	Positif (+)	<i>Pseudomonas aureginosa</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>

3.2. Isolasi DNA dan Amplifikasi

Isolasi DNA atau ekstraksi DNA merupakan suatu prosedur pemurnian DNA untuk memisahkan DNA. DNA dipisahkan dari protein, maupun komponen lainnya menggunakan metode fisik ataupun kimia. Isolasi DNA melibatkan lisis sel dan pelarutan DNA, kemudian dilanjutkan dengan metode kimia maupun enzimatik yang ditujukan untuk memisahkan DNA dari makromolekul, lipid, RNA, dan protein (Gupta, 2019). Hasil isolasi DNA dianjurkan disimpan pada suhu antara 2 – 8 °C, penyimpanan dibawah suhu 2 – 8 °C dapat menyebabkan kerusakan pada DNA.

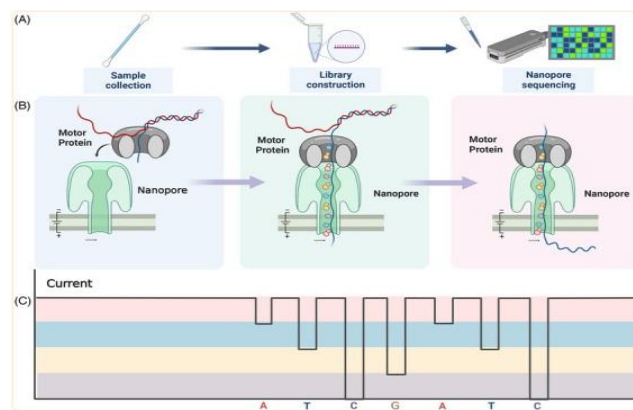
Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik amplifikasi atau perbanyakan DNA sehingga didapatkan jutaan salinan urutan target dalam waktu yang singkat (Chang *et al*, 2017). Program awal PCR diatur berdasarkan panduan standar aplikasi yang tertera pada *MasterMix Gotaq Green* Promega (M7 122) dengan penggunaan primer universal 27F – 5’ dan 1492R – 5’. Sampel hasil PCR selanjutnya dilakukan visualisasi menggunakan elektroforesis. Prinsipnya cetakan DNA sample DNA Ladder diletakkan pada sumuran gel agarose yang diberi aliran listrik, sehingga pita DNA akan bergerak menuju kutub elektroda yang berlawanan. Kecepatan fragmen DNA dipengaruhi oleh muatan dan berat molekulnya. Hasil visualisasi dengan elektroforesis sampel bakteri endofit tanaman ciplukan (Gambar 1) menunjukkan pita DNA berada pada kisaran 1.500 bp.



Gambar 1. Visualisasi hasil PCR dengan elektroforesis

3.3. Sekuensing dan Analisis Filogenetik

Sekuensing dengan metode nanopori (gambar 2) memanfaatkan pori protein berskala nano yang berfungsi sebagai biosensor yang dipasangkan pada film khusus yang diberikan tegangan listrik stabil sehingga produk asam nukleat (DNA dan RNA) dapat melewati nanopori. Sinyal elektronik yang didapatkan akan ditransmisikan berdasarkan algoritma untuk menentukan basa yang terkandung (Wang *Yunhao et al* (2021)). Sekuensing nanopori dikatakan efektif digunakan untuk identifikasi mikrobia berdasarkan gen 16S (*full-length*). memberikan informasi karena memberikan informasi metagenomik mikrobia sehingga dapat digunakan untuk mengetahui genom yang berdekatan (Zheng *et al*, 2021). Kromatogram (Gambar 2) akan tersaji dalam aplikasi, warna kromatogram menunjukkan urutan nukleotidnya. Warna merah menunjukkan *Timin*, warna hijau *Adenin*, warna hitam *Guanin*, dan warna biru *Sitosin*.

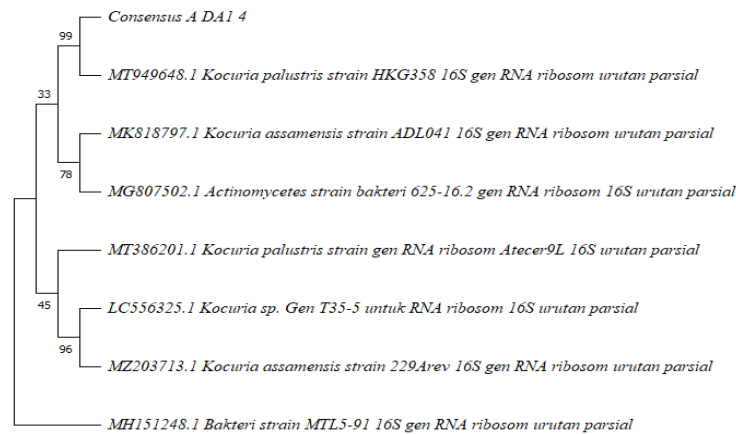


Gambar 2. Ilustrasi proses sekuensing menggunakan Oxford Nanopore Technology (ONT) (Sumber : Zheng *et al*, 2021)

Analisis Filogenetik yang dilakukan pada mikrobia bertujuan untuk memberikan informasi terkait kekerabatan antar spesies. Secara tidak langsung analisis filogenetik dapat menggambarkan evolusi yang terjadi (Oktavia *et al*, 2021). File hasil sekuensing dilakukan pengolahan dari berbentuk AB1 file menjadi data FASTA menggunakan aplikasi Bioedit. Rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan metode *neighbor joining* menggunakan *bootstrap* 1000 dan model *Kimura 2-parameter* serta menggunakan *Gaps Partial deletion* pada software MEGA X. Pada penelitian ini rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *neighbor joining*. Metode *Neighbor joining* dinilai mampu memberikan perkiraan jarak hubungan kekerabatan antar spesies secara nyata (Dharmayanti 2011 dalam Pangestika *et al*, 2015). Pernyataan Hall (2001) dalam Pangestika *et al* (2015) pemilihan nilai *bootstrap* antara 100 – 1000 ulangan dapat dipilih untuk memperkirakan tingkat keakuratan yang semakin tinggi dalam pohon filogenetik.

3.3.1. Pohon filogenetik bakteri endofit kode DA 1(4)

Bakteri kode DA 1(4) merupakan bakteri endofit yang diisolasi dari bagian daun tanaman ciplukan. Sekuen bakteri kode DA 1(4) didapatkan *contig* sepanjang 1.018 setelah dilakukan *alignment* dengan ClustalW pada software MEGA11. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik bakteri DA 1(4) menunjukkan kekerabatan terdekat dengan bakteri *Kocuria palustris strain HKG358* dengan nomor akses *MT949648.1* (gambar 3).

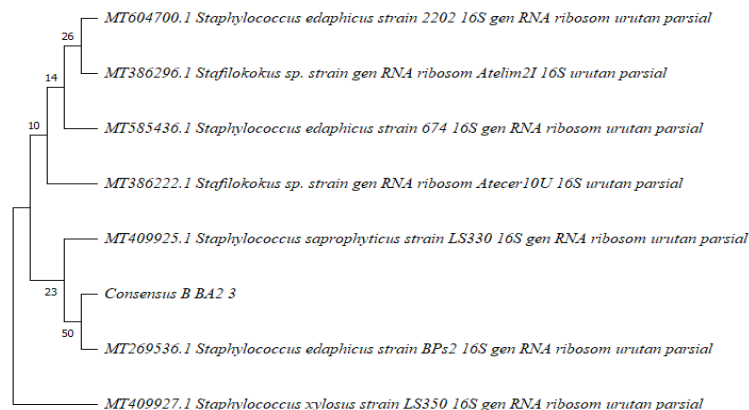


Gambar 3. Pohon filogenetik bakteri endofit kode DA 1(4)

Kocuria palustris merupakan bakteri endofit yang diisolasi dari akar dan batang tanaman *sphaeral cea angustifolia* dan merupakan bakteri gram positif yang memiliki sifat antioksidan. Mohsen *et al*, (2018) juga menyebutkan bahwa *Kocuria sp* dapat diisolasi dari tanaman, hewan, tanah, udara, dan produk fermentasi. Merupakan jenis bakteri gram positif berbentuk kokus, dan tidak membentuk endospora. Catatan Penelitian Verghese *et al* (2023) menyebutkan bahwa *Kocuria sp* normal ditemukan pada kulit manusia dan dianggap non-patogen.

3.3.2. Pohon filogenetik bakteri endofit kode BA 2(3)

Bakteri endofit kode BA 2(3) merupakan bakteri endofit yang diisolasi dari bagian daun tanaman ciplukan. Sekuen bakteri kode BA 2(3) didapatkan *contig* sepanjang 1.120 setelah dilakukan *alignment* dengan ClustalW pada *software* MEGA11. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik bakteri endofit BA 2(3) menunjukkan kekerabatan dekat dengan bakteri *Staphylococcus edaphicus* Strain BPs2, dengan nomor akses *MT269536.1* (gambar 4).

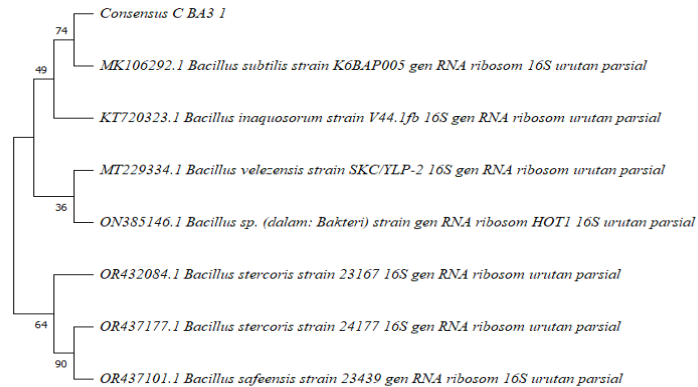


Gambar 4. Pohon filogenetik bakteri endofit kode BA 2(3)

Staphylococcus edaphicus memiliki sifat potensial merangsang pertumbuhan tanaman, berpotensi dimanfaatkan sebagai pupuk hayati (menghasilkan IAA). Memiliki kemampuan untuk bertahan dalam tekanan ekstrem, dan dapat ditemukan dari hasil isolasi tanah, tanah berpasir, dan bebatuan (Homthong *et al*, 2022). Araujo *et al* (2020) dalam penelitiannya menyoroti potensi *Staphylococcus edaphicus* secara umum terhadap perannya sebagai pemacu pertumbuhan tanaman (PGPB) yang dinilai efisien dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman pada kondisi kekurangan air.

3.3.3. Pohon filogenetik bakteri endofit kode BA 3(1)

Bakteri endofit kode DA 1(4) merupakan bakteri endofit yang diisolasi dari bagian daun tanaman ciplukan. Sekuen bakteri kode BA 2(3) didapatkan *contig* sepanjang 903 setelah dilakukan *alignment* dengan ClustalW pada *software* MEGA11. Hasil pohon filogenetik bakteri endofit BA 3(1) menunjukkan kekerabatan paling dekat dengan *Bacillus subtilis* strain K6BAP005 dengan nomor akses *MK106292.1* (Gambar 5).



Gambar 5. Pohon filogenetik bakteri endofit kode BA 3(1)

Secara umum bakteri *Bacillus subtilis* dimanfaatkan sebagai agen pengendali penyakit tanaman. Penelitian Suriani dan Amran (2016), dimanfaatkan sebagai agen pengendali untuk penyakit tular tanah pada tanaman jagung. *Bacillus subtilis* mampu bersifat patogen terhadap mikroorganisme penyebab penyakit tular tanah pada tanaman, sehingga tidak menyebabkan penyakit pada tanaman. Hashem *et al* (2019) dalam penelitiannya menyebutkan spesies *Bacillus* merupakan jenis utama *rhizobacteriae* yang dapat membentuk spora dan dapat bertahan hidup dalam tanah untuk waktu yang lama. Mekanisme *Bacillus subtilis* dalam pengendalian hayati terjadi secara langsung dan tidak langsung.

3.3.4. Pohon filogenetik bakteri endofit kode BU 3(5)

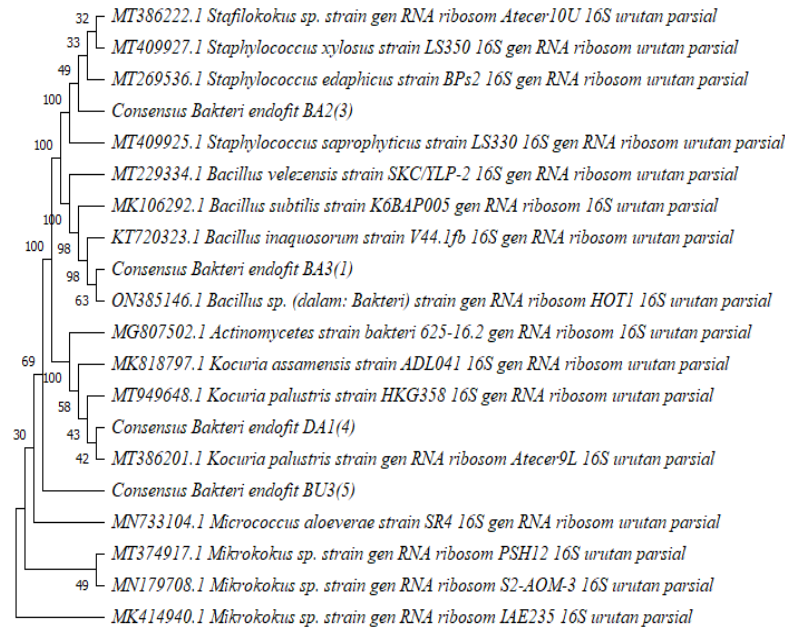
Bakteri kode DA 1(4) merupakan bakteri endofit yang diisolasi dari bagian daun tanaman ciplukan. Sekuen bakteri kode BA 2(3) didapatkan *contig* sepanjang 897 setelah dilakukan *alignment* dengan ClustalW pada *software* MEGA11. Rekonstruksi pohon filogenetik bakteri endofit kode BU 3(5) menunjukkan kekerabatan paling dekat dengan *Mikrokokkus* so. *Strain PSH12* dengan nomor akses *MT374917* (gambar 6).



Gambar 6. Pohon filogenetik bakteri endofit kode BU 3(5)

Genus *Mikrococcuss* termasuk didalamnya *Mikrococcus* sp, *Mikrococcus luteus*, *Mikrococcus aloe verae*, secara umum sangat memiliki kesamaan genetik yang sangat dekat. Hasil blast pada website NCBI menunjukkan kecocokan diatas 98%. *Mikrococcus* sp merupakan jenis bakteri gram positif dengan uji koagulase negatif (Environment and Climate Change Canada, 2018). Didukung dari penelitiang Huang *et al* (2019) menyebutkan bahwa *Mikrococcus* sp termasuk didalamnya *Mikrococcus*

aloeverae, *Mikrococcus luteus*, *Micrococcus yunnanensis* secara genetik berkerabat dekat sehingga sering dikategorikan sebagai *Mikrococcus luteus*. Prakash *et al* (2014) dalam penelitiannya menyebutkan *Micrococcus aloevarae* merupakan bakteri gram positif yang diisolasi dari tanaman aloe vera.



Gambar 7. Pohon filogenetik bakteri endofit DA 1(4), BA 2(3), BA 3(1), dan BU 3(5) dengan bakteri pembanding hasil blast NCBI

4. Kesimpulan

Identifikasi molekuler berdasarkan gen 16S rDNA menunjukkan bakteri endofit potensial antibakteri asal tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) memiliki kekerabatan dekat dengan beberapa genus bakteri. Bakteri endofit kode DA 1(4) memiliki kekerabatan dekat dengan *Kocuria palustris* dengan kemiripan 100%. Bakteri endofit kode BA 2(3) memiliki kekerabatan dekat dengan *Staphylococcus edapicus* dengan kemiripan 100%. Bakteri endofit kode BA 3(1) memiliki kekerabatan dekat dengan *Bacillus subtilis* dengan kemiripan 100%. Serta bakteri endofit kode BU 3(5) memiliki kekerabatan dekat dengan *Mikrococcus sp* dengan kemiripan 100%.

5. Ucapan Terimakasih

Penelitian ini dapat terlaksana dengan baik, tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Penulis mengucapkan terimakasih kepada seluruh keluarga besar Program Studi Bioteknologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta.

Daftar Pustaka

- Alqamari, Muhammad. L., Dafini. Mawar. Tarigan., Alridiwirasih. (2017). Budidaya Tanaman Obat dan Rempah. Medan. USMU Press.
- Amran. Muis., dan Suriani. (2016). "Prospek *Bacillus subtilis* sebagai agen pengendali hayati pathogen tular tanah pada tanaman jagung". Jurnal penelitian dan pengembangan pertanian. Vol 35 (1).
- Chang. Dingran., Kha. Tram., Ben. Li., Qian. Feng., Zhifa. Shen., Christine. H. Lee., Bruno. J. Selena., dan Yingfu. Li. (2017). Detection Of DNA Amplicons Of Polymerase Chain Reaction Using Litmus Tesr. Science Report. 7 : 3110
- Chen. Y., et al. (2015). High Speed BLASTN : An accelerated MegaBLAST search tool. *Nucleid Acid Research*. Vol 43 (16)
- Desriani, D., Safira, U. M., Bintang, M., Rivai, A., & Lisdiyanti, P. (2014). Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Endofit Dari Tanaman Binahong Dan Katepeng China. Jurnal Kesehatan Andalas, 3(2)

- Dharmayanti. (2011). Filogenetika Molekuler : Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Jurnal Watazoa*. Vol 21 (1), 1-10.
- Hashem. A., Tabassum. B., dan Fathi. Abdullah. (2019). "Bacillus subtilis : A Plant-growth promoting rizhobacterium that also impacts biotic stress". *Saudi J Biol Sci*. Vol 5(4)
- Huang. Chien-Hsun., Wang. C. L., Liou. J. S., Lee. A. Y., Blom. J., Huang. L., dan Watanabe. K. (2019). "Reclasification of Micrococcus aloeverae and yunnanensis as later heterothypic synonyms of Micrococcus luteus". *J Syst Evol Microbiol*. Vol 69(11)
- Irawan. B. (2013). Karsinologi Dengan Penjelasan Deskriptif dan Fungsional. Surabaya. Terbitan Universitas Airlangga.
- Karst. S. M., *et al.* (2018). Retrieval Of A Million High-Quality, Full Lenght Microbial 16S and 18S rRNA Gene Sequences Without Primer Bias. *Nat Biotechnol*. Vol 36 (2).
- Kasi. Pauline. D., *et al.* (2019). Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Cair Sagu dengan Gen 16S rRNA. *Majalah Ilmiah Biologi Biosfera ; A Scientific Journal*. Vol 36 (1).
- Mohsen. A. A. Al. Bayatee., dan Essra Gh. Alsammak. (2022). "Phanetic and phylogenetic analysis of kocuria palustris and rizophila strans isolated from healthty thalassemia persons". *Scientific Journal Of Medical Research*. Vol. 2 No. 7 (135-146).
- Pangestika. Yuliandini., Anto. Budiharjo., dan Hermin Pancasakti. Kusumaningrum. (2015). " Analisis filogenetik *Curcuna zedoaria* (Temu putih) berdasarkan gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS)". *Jurnal Biologi*. Vol. 4 No. 4
- Praksh. Om., Yogesh. Nimonkar., Hitendra. Munot., Avinash. Sharma., Venkata. Ramana. V., Mahses. S. C., Yogesh. S. S. (2014). "Description of Micrococcus aloeverae sp. Nov., endophytic actinobacterium isolated from Aloe vera". *International Journal Of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol 66 (18)
- Rang F. J., *et al.* (2018). From Squiggle to Basepairs : Computational Approaches For Improving Nanophore Sequencing Read Accuracy. *Genome Biol*. Vol 19 (1).
- Rustamova. Nigora., *et al.* (2020). Endophytic Bacteriae Associated With Medicinal Plant Vernonia anthelmintica: Diversity and Characterization. China. *Journal Current Microbiology*.
- Rustikawati. R. Teti., dan Lilis. Supratman. (2021). Uji Antibakteri Obat Kumur Ekstrak Etanol Tanaman Ciplukan (*Physalis angulata* l.) Terhadap Bakteri Gram Positif. *Jurnal Pendidikan dan Biologi.*, Vol 13 (1)
- Setianah. Heni., *et al.* (2020). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofitt Asal Daun Ciplukan (*Physalis angulata* L.) Terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Health Of Studies*. Vol 5 (1).
- Subari. Shmad., Razak. Sbdul., dan Sumarmin. Ramadhan. (2021). Phylogenetic Analysis of Rasbora spp. Based on The Mitochondrial DNA COI gene in Harapan Forest. *Jurnal Biologi Tropis*. Vol 21 (1), 89-94
- Verghese. Gerlin., Jamwal. A., Sarawat. D., Sahu. C., Patel. S. S., dan Tejan. N. (2023). "Case Report: case series of kocuria palustris bacteremia among immunocompromised patient". *Journal Trop Med*. Vol. 109 (5)
- Vetrovsky. Thomas., and Baldrian. Petr. (2013). "The Variability of the 16S rRNA Gene in Bakterial Genomes and it Consequences for Bacterial Community Analyses. *Plos One*. Vol 8 (2).
- Wang. Yunhao., Yue. Zhao., Audrey. Bollas., Yuru. Wang., dan Kin. Fai. Au. (2021). "Nanophore sequencing technology, bioinformatics, and application". *Nature Biotechnology*. Vol. 39 No. 11
- Zheng. Peijie., Chuntao. Zhou., Ding. Yuemin., Bin. Liu., Liuyi. Lu., Feng. Zhu., dan Shiwei. Duan. (2023). Nanophore sequencing technology and its aplication. *Medcomm*. 4(4).