

JURNAL METAMORFOSA
Journal of Biological Sciences
ISSN: 2302-5697
<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Tanaman Karet (*Hevea Brasiliensis*) dan Aktivitasnya dalam Memproduksi Inhibitor Alfa-Amilase

Molecular Identification of Endophytic Bacteria from the Rubber Plants (*Hevea Brasiliensis*) and Activities in Producing Inhibitor Alpha-Amylase

Vanisa Sri Elvani¹, Syauqi Susana Rahmani², Safrida Dwiningsih³, Tetty Marta Linda^{4*}, Windi Dona Fitri⁵

^{1,2,3,4}Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau

⁵Laboratorium Mikrobiologi dan Bioproses program Studi Biologi, Universitas Riau

*Email: tetty.martalinda@lecturer.unri.ac.id

INTISARI

Bakteri endofit adalah bakteri yang ditemukan di dalam jaringan tanaman dan diketahui dapat menghasilkan metabolit sekunder salah satunya inhibitor α -amilase. Potensi tanaman berhubungan erat dengan mikroorganisme endofit yang ada di dalam jaringan tanaman. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui potensi bakteri endofit tanaman karet untuk memproduksi inhibitor α -amilase dan identifikasi molekuler menggunakan sekuen gen 16S rRNA. Isolat yang digunakan adalah bakteri endofit isolat L1M1.A2, L1M1.B4, dan L2M1.A27. Uji aktivitas inhibitor α -amilase dilakukan secara *in vitro* dan pengukuran spektrofotometri pada panjang gelombang 540 nm. Isolat endofit yang menunjukkan nilai inhibitor tertinggi diidentifikasi menggunakan sekuen gen 16S rRNA dengan primer 8F dan 1492R. Hasil penelitian diperoleh isolat L1M1.A2 menghasilkan inhibitor α -amilase sebesar 29,44% dan teridentifikasi sebagai *Bacillus proteolyticus* dengan homologi 99,86%. Isolat L1M1.A2 dapat dikembangkan potensinya sebagai kandidat produser bahan antidiabetes.

Kata kunci: bakteri endofit, tanaman karet, inhibitor α -amilase, antidiabetes, *Bacillus proteolyticus*

ABSTRACT

Endophytic bacteria are bacteria found in plant tissues and known to produce secondary metabolites, one of which is an α -amylase inhibitor. Plant potential is closely related to endophytic microorganisms present in plant tissues. The study aimed to determine the potential of endophytic bacteria in rubber plants to produce α -amylase inhibitors and to molecular identify using the 16S rRNA gene sequence. The isolates used were endophytic bacteria isolates L1M1.A2, L1M1.B4, and L2M1.A27. The activity of α -amylase inhibitor was tested by *in vitro* and spectrophotometric measurements at a wavelength of 540 nm. Endophytic isolates with the highest inhibitory values were identified using the 16S rRNA gene sequence with primers 8F and 1492R. The results showed that the L1M1.A2 isolate produced 29.44% α -amylase inhibitor and was identified as *Bacillus proteolyticus* with 99.86% homology. The potential of the L1M1.A2 isolate could be developed as a candidate for producing an antidiabetic material.

Keywords: endophytic bacteria, rubber plant, α -amylase inhibitor, antidiabetic, *Bacillus proteolyticus*

PENDAHULUAN

Endofit adalah mikroorganisme simbiosis mutualistik yang terdapat di dalam jaringan tanaman inang tanpa menimbulkan efek. Mikroorganisme endofit dapat berupa bakteri, *actinomycetes* dan jamur (Chigurupati *et al.*, 2019). Potensi beberapa bakteri endofit yaitu: memproduksi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) tanaman (Gusmaini *et al.*, 2013), menghasilkan antibiotik (Yani *et al.*, 2019), fiksasi nitrogen sebagai pupuk hayati (Zain *et al.*, 2018) dan menghasilkan enzim kitinase (Linda *et al.*, 2018).

Bakteri endofit berpotensi menghasilkan berbagai senyawa bioaktif yang bersumber dari metabolit sekunder inangnya (Pratiwi, 2019). Hal ini disebabkan karena simbiosis yang telah lama terjadi antara inang dan endofit (Chigurupati *et al.*, 2019). Menurut Maheshwari (2017) simbiosis antara bakteri endofit dan inangnya (tanaman) memberikan respon positif dapat meningkatkan serapan hara tanah dan ketahanan tanaman, secara tidak langsung dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder. Mastufah *et al.* (2019) melaporkan hasil uji fitokimia pada bakteri endofit yang bersimbiosis dengan daun tanaman sukun (*Artocarpus altilis*) diperoleh bahwa bakteri endofit tersebut dapat menghasilkan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan terbukti bakteri endofit tersebut memiliki aktivitas antibakteri. penggunaan endofit dalam bidang kesehatan memberikan keuntungan karena pertumbuhannya yang cepat, *reproducible*, tidak terbatas, dan tidak bergantung pada iklim atau musim. Salah satu pemanfaatan mikroba endofit dalam bidang kesehatan yaitu sebagai antidiabetes (Chigurupati *et al.*, 2021; Linda *et al.*, 2023).

Umumnya penyakit DM diatasi dengan suntikan insulin atau menggunakan obat terapi yang diolah secara kimiawi seperti glukagon, biguanida (Singh, 2016) dan *acarbose* yang bertindak sebagai inhibitor enzim α -amilase dan α -glukosidase (Sales *et al.*, 2012). Namun, hal tersebut dapat memberikan efek bagi tubuh seperti kenaikan berat badan (Rosdiana, 2014). Selain itu, juga dapat menyebabkan diare dan perut kembung sehingga pemanfaatan bahan

alami sebagai obat diabetes cenderung menjadi pilihan masyarakat (Pujiyanto *et al.*, 2018).

Sejumlah tanaman telah dilaporkan memiliki sifat antidiabetes berdasarkan daya hambat (inhibitor) terhadap enzim α -amilase dan α -glukosidase (Devi *et al.*, 2019; Fatmawati *et al.*, 2021). Ishnava dan Motisariya (2018) melaporkan bahwa aktivitas antidiabetes terjadi karena adanya senyawa aktif yang dihasilkan tanaman, seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan sterol. Patel dan Manigauha (2018) juga melaporkan bahwa senyawa aktif seperti flavonoid dan golongan polifenol pada tanaman *Alangium salvifolium* memiliki aktivitas antidiabetes. Berdasarkan hasil uji fitokimia dari akar tanaman karet (*Hevea brasiliensis*) diketahui mengandung alkaloid, karbohidrat, glikosida, saponin, fitosterol, protein, lemak dan minyak lemak (Seeam *et al.*, 2018). Sementara itu, Singh dan Kumar (2015), melaporkan bahwa daun tanaman karet memiliki kandungan metabolit sekunder yang tidak jauh berbeda dari akarnya, yaitu flavonoid, alkaloid, karbohidrat, saponin, tanin, steroid, dan protein. Selain di organ tanaman diketahui juga pada bakteri endofit mengandung senyawa fitokimia. Menurut Linda *et al.*, (2022) bakteri endofit dari daun steril tumbuhan paku laut (*Acrstostichum aureum* L.) di laporkan mengandung senyawa fitokimia alkaloid dan saponin.

Penelitian potensi bakteri endofit diantaranya isolat DS21 yang diisolasi dari daun tanaman sirsak (*Annona muricata*) menghasilkan inhibitor α -amilase sebesar 72,22% (Pujiyanto *et al.*, 2018). Susilowati (2019) juga melaporkan hasil penelitiannya menggunakan bakteri endofit yang diisolasi dari buah salak pondoh (*Salacca edulis*), bakteri tersebut memiliki aktivitas inhibitor α -glukosidase dengan persentase tertinggi 62,95% yang diketahui sebagai genus *Paenibacillus* melalui identifikasi molekuler menggunakan sekuen gen 16S rRNA. Suhandono *et al.* (2016) melakukan identifikasi molekuler bakteri endofit dari buah rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) menggunakan sekuen gen 16S rRNA dengan primer 8F dan 1492R, diketahui bakteri tersebut dari genus *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Staphylococcus*, dan

Curtobacterium. Linda *et al.* (2018) melaporkan hasil identifikasi isolat bakteri endofit D35 dari daun tanaman karet diketahui memiliki homologi 99% dengan *Klebsiella variicola* strain F2R9.

Kandungan senyawa fitokimia di dalam tanaman karet dan simbiosisnya dengan bakteri endofit menjadikan tanaman ini berpotensi sebagai penghasil antidiabetes salah satunya adalah inhibitor α -amilase. Penelitian ini bertujuan mempelajari potensi bakteri endofit tanaman karet dalam memproduksi inhibitor α -amilase dan identifikasi bakteri terpilih menggunakan sekuen gen 16S rRNA.

BAHAN DAN METODE

Peremajaan Bakteri Endofit Karet

Bakteri endofit L1M1.A2, L1M1.B4, dan L2M1.A27 hasil penelitian sebelumnya (Fitri, 2017) diremajakan dengan mengambil 100 μ l kultur gliserol dan ditumbuhkan pada 10 mL medium *Nutrient Broth* (NB), diinkubasi pada suhu 25°C selama 24 jam dan dikocok dengan kecepatan 150 rpm. Inokulum diinokulasikan sebanyak 0,1 mL ke medium *Nutrien Agar* (NA) dengan teknik *spread plate*. Koloni yang tumbuh dengan *streak quadrant* dipindahkan pada medium NA untuk diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam dan isolat murni selanjutnya ditumbuhkan pada agar miring dan disimpan pada 4 °C.

Karakterisasi Makroskopis dan Biokimia

Bakteri Endofit

Karakterisasi makroskopis isolat bakteri endofit dengan mengamati morfologi koloni yang meliputi warna, bentuk, tepian, dan elevasi.

Produksi Metabolit Sekunder Bakteri

Medium produksi metabolit sekunder mengandung 0,1 gr pati, 0,5 gr pepton dan 0,15 gr *yeast extract* (pH 7) yang dilarutkan di dalam 100 mL akuades. Kultur bakteri dengan populasi 10^7 CFU/mL sebanyak 1 mL ditumbuhkan pada 20 mL medium produksi. Sampel diinkubasi selama 48 jam pada suhu 25°C diagitasi dengan kecepatan 120 rpm. Sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan sel bakteri dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Hasil sentrifus diperoleh

supernatan sebagai ekstrak kasar metabolit sekunder untuk diuji aktivitas inhibitorynya terhadap enzim α -amilase. Pembuatan medium produksi ekstrak kasar bakteri mengikuti metode Pujiyanto *et al.*, (2018) dengan modifikasi jumlah kultur bakteri yang digunakan.

Uji Inhibitor α -amilase

Sampel ekstrak kasar metabolit sekunder bakteri diambil 0,5 mL yang ditambahkan 0,5 mL enzim α -amilase (0,5 unit/mL), diinkubasi selama 10 menit pada 25°C. Larutan pati (0,5%) sebanyak 1 mL ditambahkan pada tabung reaksi selanjutnya diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C. Diakhir waktu inkubasi ditambahkan reagen *dinitrosalicylic acid* (DNS) 2 mL dan dipanaskan selama 5 menit pada suhu tinggi (100°C) untuk menghentikan reaksi. Perlakuan yang sama juga dilakukan terhadap kontrol negatif, dimana 0,5 mL sampel diganti dengan akuabides. Kontrol positif *acarbose* dengan konsentrasi 10 ppm, juga diberi perlakuan yang sama dengan sampel. Masing-masing perlakuan dibuat dengan 3 kali ulangan. Absorbansi masing-masing larutan sampel diukur dengan spektrofotometer pada λ 540 nm (Pujiyanto *et al.* 2018). Pada Tabel 1. menyajikan tahapan pengujian inhibitor α -amilase. Persentase inhibitor dihitung berdasarkan rumus dari Devi *et al.* (2019):

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{(B_1 - B_0) - (S_1 - S_0)}{(B_1 - B_0)} \times 100\%$$

Keterangan:

S_1 = Sampel S_0 = Kontrol sampel

B_1 = Blanko B_0 = Kontrol blanko

Tabel 1. Tahapan pengujian inhibitor α -amilase

Reagen	Volume (mL)					
	B ₁	B ₀	S ₁	S ₀	A ₁	A ₀
Sampel	-	-	0,5	0,5	-	-
Acarbose	-	-	-	-	0,5	0,5
Akuades	0,5	1	-	0,5	-	0,5
Enzim	0,5	-	0,5	-	0,5	-
Inkubasi suhu 25°C selama 10 menit						
Substrat	1	1	1	1	1	1
Inkubasi suhu 25°C selama 10 menit						
DNS	2	2	2	2	2	2
Dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit						

Keterangan: B₁ = blanko, B₀ = kontrol blanko, S₁ = sampel, S₀ = kontrol sampel, A₁ = acarbose, dan A₀ = acarbose

Identifikasi Sekuen Gen 16S rRNA

DNA genom dari isolat bakteri diekstraksi menggunakan Kit Presto™ Mini gDNA *Bacteria* (Geneaid). Prosedur ini dilakukan sesuai dengan protokol Kit Presto™ Mini gDNA *Bacteria*. Bakteri endofit di amplifikasi sekuen gen 16S rRNA dengan primer 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) dan 1492R (GGTTACCTTGTTA CGACTT) (Suhando *et al.*, 2016). Komponen PCR dengan formulasi), yang berisi 1 μ l ekstrak DNA, masing-masing 1 μ l primer 8F, 1 μ l primer 1492R, 25 μ l 2X Taq Master Mix (Vivantis) dan 22 μ l dH₂O. Siklus PCR dimulai denaturasi 94°C 15 detik, *annealing* 49,85°C 30 detik, *extension* 72°C 1 menit selama 35 siklus, *final extension* 72°C 3 menit, 1 siklus. Hasil amplifikasi diverifikasi dengan elektroforesis menggunakan gel *agarose* 1%. Hasil PCR disekuensing oleh 1stBase.

Analisis Data

Data hasil karakterisasi makroskopis dan biokimia, serta pengukuran inhibitor α -amilase

masing-masing bakteri endofit dianalisis secara deskriptif, kualitatif, dan kuantitatif. Hasil sekuensing DNA bakteri dianalisis melalui BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool nucleotide*) yang dapat diakses melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Pohon filogenetik bakteri dibuat dengan menggunakan aplikasi MEGA6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

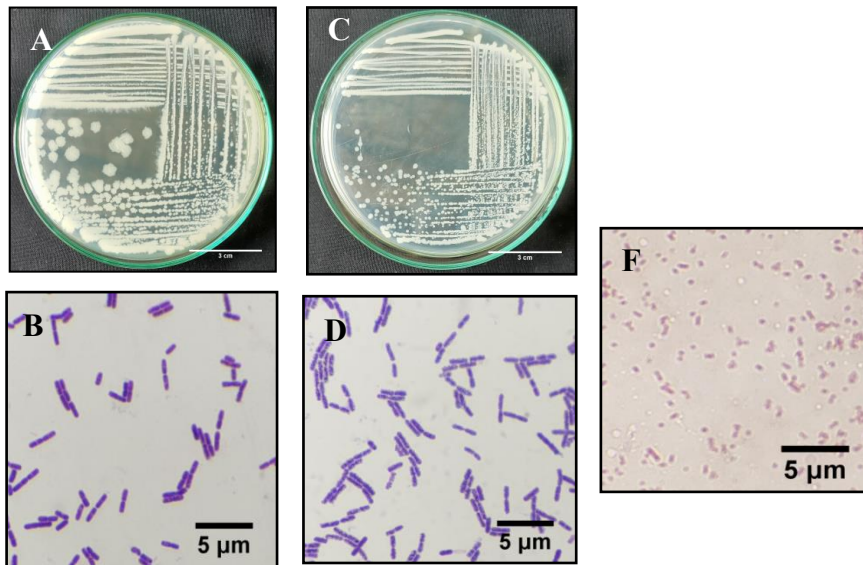
Karakterisasi Bakteri Endofit

Tiga isolat bakteri endofit hasil karakterisasi makroskopis dan uji biokimia: seperti pada Tabel 2. Hasil pewarnaan Gram isolat L1M1.A2 dan L1M1.B4 adalah Gram positif dan isolat L2M1.A27 adalah Gram negatif. Bentuk sel bakteri L2M1.A27 memiliki bentuk sel kokus sedangkan dua isolat lainnya adalah berbentuk batang. Gambar 1 menunjukkan koloni masing-masing isolat dan bentuk sel.

Beberapa peneliti sebelumnya seperti Hidayati (2014) melaporkan hasil karakterisasi bakteri endofit yang diisolasi dari daun, kulit batang, dan akar tanaman karet, bakteri endofit tersebut memiliki warna koloni putih dan kuning, serta bentuk koloni *circular* yang termasuk Gram positif dan negatif. Pujiyanto *et al.* (2015) dan Pujiyanto *et al.* (2018) melaporkan hasil karakterisasi bakteri endofit yang diisolasi dari tanaman pare dan tanaman sirsak pada organ akar, batang dan daun diperoleh hasil bakteri Gram positif dan negatif. Linda *et al.* (2022) melaporkan isolat bakteri endofit dari daun steril paku laut dengan warna koloni bakteri putih susu dan kuning dengan hasil pewarnaan termasuk kategori Gram negatif. Hal ini menunjukkan sangat beragam dijumpai bakteri endofit dari berbagai jenis tanaman.

Tabel 2. Karakterisasi bakteri endofit hasil peremajaan pada medium NA inkubasi 24 jam

Kode Isolat	Warna Koloni	Bentuk Koloni	Elevasi	Tepian	Bentuk Sel	Pewarnaan Gram
L1M1.A2	Putih	Circular	Flat	Undulate	Batang	Positif
L1M1.B4	Putih	Circular	Flat	Entire	Batang	Negatif
L2M1.A27	Putih	Circular	Flat	Entire	Bulat	Negatif



Gambar 2. Karakterisasi morfologi dan bentuk sel bakteri endofit dengan perbesaran 1000x. (A) koloni isolat L1M1.A2, (B) bentuk sel isolat L1M1.A2, (C) koloni isolat L1M1.B4, (D) bentuk sel isolat L1M1.B4, (E) koloni isolat L2M1.A27, dan (F) bentuk sel isolat L2M1.A27

Aktivitas Inhibitor α-amilase

Hasil uji aktivitas inhibitor α-amilase untuk ketiga bakteri endofit yang diuji diperoleh hanya pada isolat L1M1.A2 dengan persentase 29,44% (Tabel 3). Formulasi pengujian sampel ekstrak kasar metabolit bakteri dengan formulasi pengukuran seperti pada Tabel 1. Dua isolat lainnya L1M1.B4 dan L2M1.A27 memberikan aktivitas inhibitor α-amilase negatif. Akshatha *et al.* (2013) melaporkan hasil inhibitor α-amilase negatif dari *Streptomyces* sp. yang diisolasi dari tanaman *Rauwolfia densiflora*. Hal ini menunjukkan setiap isolat bakteri endofit memberikan aktivitas yang berbeda-beda.

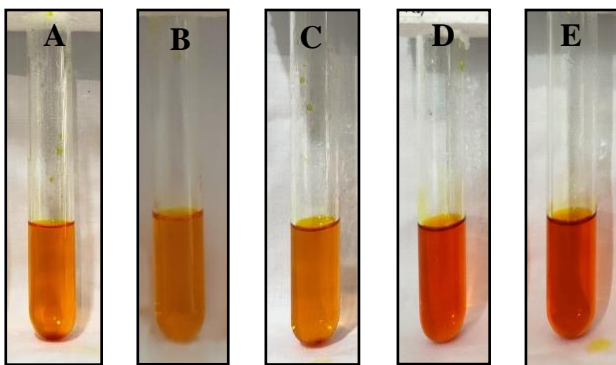
Tabel 3. Hasil uji aktivitas inhibitor α-amilase

Sampel	% Inhibitor
L1M1.A2	29,44±0,263
L1M1.B4	negatif
L2M1.A27	negatif
<i>Acarbose</i>	40,72±0,322

Chigurupati *et al.* (2019) melaporkan hasil uji inhibitor α-amilase ekstrak kasar bakteri endofit yang berasal dari daun rambutan menunjukkan nilai inhibitor terendah 20% dan tertinggi 84,55% yang diproduksi menggunakan medium *Nutrient Broth* (NB) dengan komposisi pepton, NaCl, *beef extract* yang diinkubasi

selama 3 hari. Akshatha *et al.* (2013) melaporkan inhibitor α -amilase sebesar 60,2% oleh *Streptomyces longisporoflavus* yang diisolasi dari batang tanaman *Leucas ciliate*. Ekstrak kasar metabolit *S. longisporoflavus* diproduksi menggunakan medium ISP (*International Streptomyces Project*) atau dikenal juga dengan medium *Tryptone Yeast Extract Broth* yang mengandung *yeast extract*, dan *casein hydrolysate*, dengan waktu inkubasi selama 21 hari. Berbeda spesies bakteri endofit, media yang digunakan serta waktu inkubasi memberikan aktivitas inhibitor yang berbeda-beda.

Isolat L1M1.B4 dan L2M1.A27 belum menghasilkan inhibitor α -amilase diduga karena waktu inkubasi 48 jam kedua isolat belum memasuki fase stationer untuk menghasilkan metabolit sekunder. Menurut Iqlima *et al.* (2017) fase awal stationer sampai akhir stationer dari pertumbuhan bakteri diketahui fase banyak diproduksi metabolit sekunder karena bakteri saling mempertahankan diri untuk bertahan hidup.



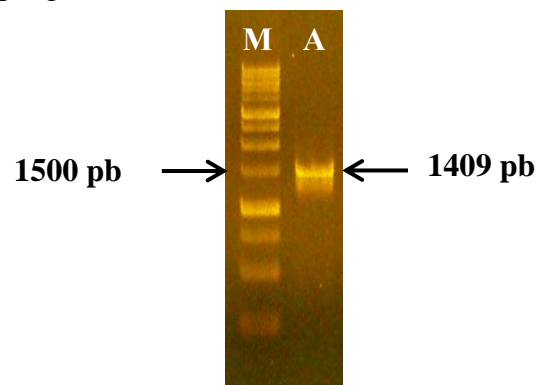
Gambar 2. Hasil reaksi ekstrak kasar metabolit sekunder bakteri endofit pada uji inhibitor α -amilase dengan reagen DNS. (A) blanko, (B) *acarbose*, (C) isolat L1M1.A2, (D) isolat L1M1.B4, dan (E) isolat L2M1.A27

Hasil reaksi uji inhibitor α -amilase antara blanko, sampel dan *acarbose* seperti pada Gambar 2. Larutan *acarbose* dan sampel isolat L1M1.A2 menunjukkan warna yang lebih cerah dibandingkan larutan blanko pada Gambar 2 (A). Menurut Prahesti *et al.* (2018) warna larutan yang semakin cerah setelah ditambah DNS menunjukkan bahwa gula pereduksi yang bereaksi dengan reagen DNS semakin kecil,

yang disebabkan karena terhambatnya hidrolisis substrat amilum oleh enzim α -amilase dalam menghasilkan produk. Pramitasari *et al.* (2017) melaporkan bahwa indikator keberhasilan pengujian inhibitor α -amilase menggunakan DNS adalah jika warna larutan berwarna kuning. Berkurangnya intensitas warna jingga maka semakin sedikit glukosa yang terbentuk sehingga persen inhibitor akan semakin tinggi (Nurjanah *et al.*, 2020). Isolat L1M1.B4 dan L2M1.A27 menunjukkan warna jingga yang lebih pekat dibandingkan blanko, yang berarti kedua isolat tersebut tidak memiliki aktivitas inhibitor α -amilase. Menurut Pramitasari *et al.* (2017) kehadiran warna jingga menunjukkan sampel yang diuji tidak memiliki aktivitas inhibitor α -amilase.

Identifikasi Sequen Gen 16S rRNA

Hasil amplifikasi PCR sequen gen 16S rRNA isolat L1M1 A2 dengan panjang fragment 1409 bp (Gambar 3). Hasil homologi *sequen partial gen 16S rRNA* yang dianalisis menggunakan BLASTn *GenBank* pada web: <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, hasil seperti pada Tabel 4. Isolat bakteri L1M1.A2 memiliki nilai similaritas sebesar 99,86% dengan *Bacillus proteolyticus*. Beberapa penelitian sebelumnya melaporkan bahwa bakteri *B. proteolyticus* memiliki potensi sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) (Kamaruzzaman *et al.*, 2020), biopestisida (Akpore *et al.* 2021), penghasil enzim L-asparaginase (Nazli *et al.*, 2021), dan potensi probiotik sebagai antioksidan dan antibiotik (Sathiyaseelan *et al.* 2022). Namun, sejauh ini belum ada penelitian yang melaporkan mengenai potensi bakteri *B. proteolyticus* sebagai penghasil inhibitor α -amilase.



Gambar 3. Elektroforesis hasil produk PCR sekuen gen 16S rRNA. (M) Marker 1Kb DNA ladder, dan (A) isolat bakteri L1M1.A2

Menurut Hidayati (2014) identifikasi bakteri endofit dari tanaman karet (*Hevea brasiliensis*) menggunakan gen 16S rRNA, diketahui sebagai *Bacillus cereus* dengan

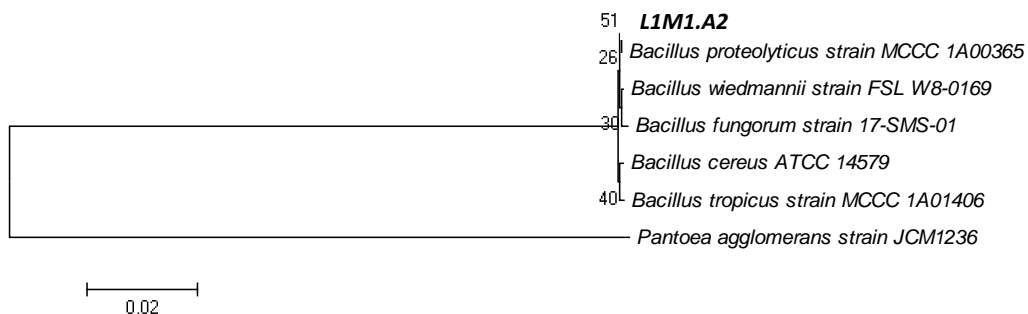
similaritas 99%. Suhandono *et al.* (2016) melaporkan hasil identifikasi bakteri endofit dari tanaman rambutan, teridentifikasi sebagai *Bacillus pumilus* dengan similaritas 97,2% dan Magdy *et al.* (2020) melaporkan hasil identifikasi bakteri endofit dari tanaman *Rosmarinus officinalis* diketahui spesiesnya adalah *Bacillus subtilis* dengan similaritas 99%.

Tabel 4. Analisis BLASTn isolat bakteri endofit L1M1.A2 menggunakan sekuen gen 16S rRNA

Description	Max Score	Query cover	E-value	Identity (%)	Accession
<i>Bacillus proteolyticus</i> strain MCC 1A00365	2590	99%	0,0	99,86%	NR_157735.1
<i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169	2588	99%	0,0	99,86%	NR_152692.1
<i>Bacillus cereus</i> strain ATCC 14579	2584	99%	0,0	99,79%	NR_074540.1
<i>Bacillus fungorum</i> strain 17-SMS-01	2582	99%	0,0	99,79%	NR_170494.1
<i>Bacillus tropicus</i> strain MCC 1A01406	2579	99%	0,0	99,72%	NR_157736.1

>A_1409pb (L1M1.A2)

AATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC
 ACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATT
 TTGAACTGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCAT
 TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
 CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
 GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGT
 TAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGC
 TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
 AGCGCGCGCAGGTGGATTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGG
 AAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTATA
 GATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGC
 GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAG
 AGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
 GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGC
 AACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGG
 GAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
 CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG
 CTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCA
 GTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATG
 CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCC
 GAAGTCGGTGGGGTAACCTTTT

Gambar 4. Urutan sekuen DNA hasil analisis pensejajaran isolat bakteri endofit L1M1.A2**Gambar 5.** Analisis pohon filogenetik isolat bakteri L1M1.A2

Analisis BLASTn diperoleh pohon filogenetik isolat L1M1.A2, seperti Gambar 5. yang menunjukkan isolat L1M1.A2 memiliki kekerabatan yang dekat dengan spesies bakteri *Bacillus proteolyticus*. Hasil penelitian Zeng *et al.* (2021) *B. proteolyticus* berhasil diisolasi dari feses Yaks (*Bos grunniens*) diketahui memiliki potensi probiotik yang ditunjukkan dengan aktivitas antioksidan penangkap radikal hidroksil yang tinggi dan aktivitas antibakteri terhadap *Escherchia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Salmonella enteritidis*. Penelitian Liu *et al.* (2017) *Bacillus proteolyticus* yang berasal dari sedimen Samudera Pasifik memiliki karakter Gram positif, fakultatif anaerob, non-motil, bentuk sel batang, dengan lebar 1,6-1,8 μm dan panjang 2,8-3,6. Perbedaan sumber isolat menunjukkan keragaman bakteri yang berhasil diisolasi dan perbedaan potensinya.

KESIMPULAN

Hasil uji aktivitas inhibitor α -amilase hanya isolat L1M1.A2 yang memiliki inhibitor sebesar 29,44%. Hasil identifikasi sekuen gen 16S rRNA isolat L1M1.A2 memiliki indeks similariti 99,86% dengan *Bacillus proteolyticus*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Direktorat Belmawa-Dikti melalui Program Kreativitas Mahasiswa Penelitian (PKM-RE) Tahun 2021 yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Akpor, O.B., O.D. Akinwusi, and T.A. Ogunnus. 2021. Production, Characterization and Pesticidal Potential of *Bacillus* Spesies Metabolites Against Sugar Ant (*Camponotus consobrinus*). *Heliyon*. 7 e08477.
- Akshatha, V.J., M.S. Nalini, C. D'Souza, and H.S. Prakash. 2013. Streptomycete Endophytes from Anti-diabetic Medicinal Plants of the Western Ghats Inhibit Alpha-amylase and Promote Glucose Uptake. *Letters in Applied Microbiology*. 58: 433-439.
- Chigurupati, S., S. Vijayabalan, A. Karunanidhi, K.K. Selvarajan, S.S. Nanda, and R. Satpathy. 2019. Antidiabetic, Antioxidant and *In Silico* Studies of Bacterial Endosymbiont Inhabiting *Nepheium lappaceum*. *Ovidius University Annals of Chemistry*. 30 (2): 95-100.
- Chigurupati, S., S. Vijayaban, V.R. Palanimuthu, S. Das, and S. Bathia. 2021. Bacterial Endophyte Inhabiting *Durio zibethinus* and its Radical Scavenging and Antidiabetic Potential. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 55 (3): 857-862.
- Devi, S., M. Rahmah, dan N.R. Jannah. 2019. Analisis Infusa dan Ekstrak Etanol *Tamarindus indica* L, *Scurrula* Sp, *Mimosa pudica* D Segar dan Kering sebagai Inhibitor Enzim Amilase. *Jurnal Natur Indonesia*: 17 (2): 25-31.

- Fatmawati, Susilawati, L.D. Oswari, Fadiya, dan Nadya. 2021. Uji aktivitas Penghambatan Enzim α -glukosidase Ekstrak Air dan Ekstrak Etanol Kayu Kuning (*Arcangelisia flava*). *Jurnal kedokteran dan Kesehatan*. 8 (1): 54-62.
- Fitri, D.W. 2017. Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Karet (*Hevea brasiliensis*) dan Uji Antagonis terhadap jamur Akar Putih (*Rigidoporus microporus* (Swartz:Fr) Van Ov) (Skripsi), Riau: Universitas Riau.
- Gusmaini, S.A. Aziz, A. Munif, D. Sopandie, dan N. Bermawie. 2013. Potensi Bakteri Endofit dalam Upaya Meningkatkan Pertumbuhan, Produksi, dan Kandungan Andrografolid pada Tanaman Sambiloto. *Jurnal Litri*. 19 (4): 167-177
- Hidayati, U. 2014. Potensi Bakteri Endofit Asal Tanaman Karet sebagai Penghasil Pemacu Pertumbuhan Bibit Batang Bawah Tanaman Karet (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) (Disertasi), Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Iqlima, D., P. Ardiningsih, dan M.A. Wibowo. 2017. Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofit B_{2D} dari Batang Tanaman Yakon (*Smallanthus Sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Rob.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypimurium*. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 7 (1): 36-43.
- Ishnava, K.B. and D.M. Motisariya. 2018. In-vitro Study on α -amylase Inhibitory Activity of Selected Ethnobotanical Plant Extracts and its Herbal Formulations. *International Journal Pharmacognosy and Chinese Medicine*. 2 (3): 1-11.
- Kamaruzzaman, M.A., S.R.S. Abdullah, M. Hassan, A.R. Othman, dan M. Idris. 2020. Characterization of Pb-Resistant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) from *Scirpus grossus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 101456.
- Linda, T.M., S. Siregar, W.D. Fitri, A. Martina, W. Lestari, D.I. Roslim, and Hapsoh. 2018. Isolation and Screening of Culturable Endophytic Bacteria from Leaf of Rubber Plant that Produces of Chitinase. *Journal of Physics: Confrence Series 1116*.
- Linda, T.M., B.L. Fibriarti, D. Zul, N. Sofiyanti, A. Berlyansah, N. Delfira, and S. Devi. 2023. Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria from Sterile Leaf of *Acrostichum aureum* from Bengkalis Island (Riau,Indonesia) and its Potency for Antidiabetic. *Biodiveristas*. 24(3): 1580-1588.
- Linda, T.M., A. Berlyansah, B.L. Fibriarti, N. Sofiyanti, and S. Devi. 2022. Isolation and Analysis of Bioactive Compounds Endophytic Bacteria of Sea Fern (*Acrtostichum aureum* L.) from Bengkalis Island, Riau. *Jurnal Biologi Tropis*. 22 (1): 46-54.
- Liu, Y., J. Du, Q. Lai, R. Zeng, D. Ye, J. Xu, and Z. Shao. 2017. Proposal of Nine Novel Species of the *Bacillus cereus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67: 2499-2508.
- Magdy, A., A. Gharbia, R.M. Mohamed, and A. Awad. 2020. Metabolic Profilling of Endophytic *Bacillus subtilis* US2 Isolated from *Rosmarinus officinalis* Leaves with Potential Antimicrobial Activity. *Jorunal of Pharmaceutical and Applied Chemistry an International Journal*. 6 (1): 9-20.
- Maheshwari, D.K. (Ed). 2017. *Endophytes: Biology and Biotechnology Volume 1*, India: Springer Nature.
- Mastufah, P. Ardiningsih, dan A. Jayuska. 2019. Aktivitas Antibakteri dari Isolat Bakteri Endofit B.E2 Daun Tanaman Sukun (*Artocarpus altilis*) terhadap *S. typhimurium* dan *S.aureus*. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 8 (1): 79-85
- Nazli, N., R. Masood, M. Salman, B. Nasir, F. Shireen, A. Mehmood, S.A. Bangash, F. Hussain, and S. Ahmad. 2021. Isolation and Identification of the Potential Novel L-asparaginase Producing Strains from Soil. *Abasyin Journal of Life Sciences*. 4 (1): 11-19.
- Nurjanah, S., E. Marlina, dan S. Astuti,. 2020. Uji Aktivitas Inhibisi Amilase pada Tanaman *Melicope* yang Berpotensi

- sebagai Antidiabetes. *Jurnal Atomik*. 5 (2): 94-98.
- Patel, A.K., and A. Manigauha. 2018. Antioxidant and Antidiabetic Activity of Isolates Flavonoids from *Alangium salvifolium* Leaves Extracts. *International Journal of Green Pharmacy*. 12 (2): 82-90
- Prahesti, D.A., S. Pujiyanto, dan M.G.I. Rukmi. 2018. Isolasi, Uji Aktivitas, dan Optimasi Inhibitor α -amilase Isolat Kapang Endofit Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia*) (Ten.) Steenis. *Jurnal Biologi*. 7 (1): 43-51
- Pramitasari, M.D., S. Pujiyanto, dan A. Suprihadi. 2017. Aktivitas Inhibitor α -amilase Isolat Khamir Endofit dari Tumbuhan Brotowali (*Tinospora crispa* L.). *Jurnal Biologi*. 6 (3): 76-84.
- Pratiwi, R.H. 2019. Peranan Mikroorganisme Endofit dalam Dunia Kesehatan: Kajian Pustaka. *Jurnal Ilmiah Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*. 16 (1): 21-32.
- Pujiyanto, S., Sunarno, dan A. Widyasari. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit Penghasil Inhibitor α -glukosidase dari Tanaman Pare (*Momordica charantia* L). Pros. SNST ke-6, Fak. Teknik UNWAHAS, Semarang 2015, hal. 65-71.
- Pujiyanto, S., M. Resdiani, B. Raharja, and R.S. Ferniah. 2018. α -Amylase Inhibitor Activity of Endophytic Bacteria Isolated from *Annona muricata* L. *Journal of Physics: Conference Series* 1025.
- Rosdiana, D. 2014. Penggunaan Insulin Basal dalam Praktek Sehari-hari: Panduan Praktis untuk Dokter Umum. *Jurnal Ilmu Kedokteran*. 8 (2): 53-57.
- Sales, P.M.D., P.M.D. Souza, L.A. Simeoni, P.D.O. Magalhaes, dan D. Silveira. 2012. α -amylase Inhibitor: A Review of Raw Material and Isolated Compunds from Plant Source. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 15 (1): 141-183
- Sathiyaseelan, A., K. Saravanakumar, K. Han. K.V. Naveen, and M.H. Wang. 2022. Antioxidant and Antibacterial Effects of Potential Probiotics Isolated from Korean Fermented Foods. *International Joournal of Molecular Sciences*. 23, 10062.
- Seeam, S.M., A.S.M.M. Islam, G.S. Raju, A. Istiaq, M.S. Rana, M.H. Babu, M.M. Rahman, M.J. Islam, M.L. Hakim, and P. Das. 2018. Biomedical and Phytochemical Study of Methanol Extract of *Hevea brasiliensis* Roots in Swiss Abino Mice. *Discovery Phytomedicine*. 5 (4): 48-51.
- Singh, S.J. and S.S. Kumar. 2015. Phytochemical and Antibacterial Efficacy of *Hevea brasiliensis*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 7 (12): 777-783.
- Singh, V.P. 2016. An Overview on Anti Diabetic Drugs and Development. *Science and Technology Journal*. 4 (2): 113-123.
- Suhandono, S., M.K. Kusumawardhani, and P. Aditiawati. 2016. Isolation and Molecular Identification of Endophytic Bacteria from Rambutan Fruits (*Nephelium lappaceum* L.) Cultivar Binjai. *Hayati Journal of Biosciences*. 23 : 39-44.
- Susilowati, A., C.B.Y. Dewi, and S.L.A. Sari. 2019. Isolation and Identification of Endophytic Bacteria from Salak Pondoh (*Salacca edulis*) fruit as α -glycosidase Inhibitor Producer. *Journal of Biology & Biology Education*. 11 (3): 352-359.
- Yani, R.B., A. Agustien, dan F. Alamsjah. 2019. Pengaruh pH dan Suhu terhadap Produksi Antibiotika dari Isolat Bakteri Endofitik pada Tumbuhan Andalas (*Morus macroura* Miq.). *Metamorfosa*. 6 (1): 90-96.
- Zain, N.M., T. Bachtiar, dan Sugoro, I. 2018. Kontribusi Nitrogen dari Bakteri Endofit pada Tanaman Padi. *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi*. 14 (1): 1-10
- Zeng, Z., X. He, F. Li, Y. Zhang, Z. Huang, Y. Wang, K. Li, Y. Bao, M. Iqbal, M.F.A. Kulyar, and J. Li. 2021. Probiotic Properties of *Bacillus proteolyticus* Isolated from Tibetan Yaks, China. *Frontiers in Microbiology*. 12:649207.