

Variasi Metode Ekstraksi Metabolit Sekunder Bakteri Endofit Daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*

Hasyim Abdurrasyid¹, Ibnu Mubarak², Dewi Mustikaningtyas¹, Pramesti Dewi^{✉ 2}

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Indonesia

²Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Indonesia

Info Artikel

Diterima: 10 Maret 2024
Disetujui: 19 Oktober 2024
Dipublikasikan: 07 November 2024

Keywords:

antibacterial; endophytic bacteria, maceration, methanol, rambutan leaf antibakteri; bakteri endofit, maserasi, metanol, daun rambutan

Abstract

Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) is one of the many tropical plants found in Indonesia. The leaves of the rambutan plant are known to be used as medicine, so they have the potential to be a source of endophytic bacteria that can produce beneficial compound. This study aims to isolate, identify of endophytic bacteria from rambutan leaves, and test their activity as an antibacterial with two different secondary metabolite extraction methods, namely maceration with 70% methanol and without maceration. This study used experimental research with a Completely Randomized Design (CRD). Isolation of endophytic bacteria from rambutan leaves produced two isolates (D1 and D2). The results of identification through macroscopic, microscopic, and biochemical test showed that two pure isolates had similarities to genus *Bacillus* sp. Antibacterial activity testing was carried out using well diffusion method. Based on the results of antibacterial test showed that extraction method with 70% methanol produced an extract that was more effective as an antibacterial with average diameter of clear zone formed for *Escherichia coli* bacteria were 13.55 mm (Isolate D1) and 12.13 mm (Isolate D2) and that of *Bacillus subtilis* bacteria were 16.27 mm (Isolate D1) and 19.69 mm (Isolate D2). This finding contributes to the fact that the type of secondary metabolite extraction method of rambutan leaf endophytic bacteria influences the sensitivity as an antibacterial.

Abstrak

Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) merupakan salah satu tanaman tropis yang banyak ditemukan di Indonesia. Daun tanaman rambutan diketahui dapat dijadikan sebagai obat sehingga memiliki potensi sebagai sumber bakteri endofit yang dapat menghasilkan senyawa bermanfaat. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengidentifikasi bakteri endofit dari daun rambutan, dan menguji aktivitasnya sebagai antibakteri dengan dua metode ekstraksi metabolit sekunder yang berbeda, yaitu maserasi dengan metanol 70% dan tanpa maserasi. Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Isolasi bakteri endofit daun rambutan menghasilkan dua isolat (D1 dan D2). Hasil identifikasi secara makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia menunjukkan bahwa kedua isolat murni memiliki kemiripan dengan genus *Bacillus* sp. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi sumuran. Berdasarkan hasil uji antibakteri menunjukkan bahwa metode ekstraksi dengan metanol 70% menghasilkan ekstrak yang lebih efektif sebagai antibakteri dengan rerata diameter zona bening yang terbentuk pada bakteri *Escherichia coli* sebesar 13.55 mm (Isolat D1) dan 12.13 mm (Isolat D2) serta bakteri *Bacillus subtilis* sebesar 16.27 mm (Isolat D1) dan 19.69 mm (Isolat D2). Temuan ini menghasilkan kontribusi bahwa jenis metode ekstraksi metabolit sekunder bakteri endofit daun rambutan berpengaruh terhadap sensitivitasnya sebagai antibakteri.

© 2024 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:
Gedung D6 Lt.1 Jl Raya Sekaran Gunungpati, Semarang
E-mail: iwed_pramesti@mail.unnes.ac.id

p-ISSN 2252-6277
e-ISSN 2528-5009

PENDAHULUAN

Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) merupakan salah satu jenis tanaman tropis. Thailand, Malaysia, dan Indonesia menjadi tiga negara terbesar pembudidaya buah rambutan sebanyak 80% dari total produksi buah rambutan di dunia dan menjadi pengekspor buah rambutan ke negara lain khususnya pada kawasan Asia (Ahmad & Chua, 2013; Chai *et al.* 2019; Jahurul *et al.* 2020). Tingginya produksi rambutan didukung oleh data Badan Pusat Statistik (BPS) yang mencatat bahwa produksi rambutan di Indonesia mencapai 855.162 ton pada tahun 2022. Rambutan banyak dibudidayakan oleh masyarakat Indonesia karena memiliki beraneka macam manfaat. Lisdiana & Dewi (2017), menyebutkan jika daun, akar, biji, dan kulit batang tanaman rambutan dapat dijadikan sebagai obat. Diperkuat oleh Afzaal *et al.*, (2023), kadar protein, mineral, vitamin, karbohidrat, dan antioksidan yang terkandung dalam buah rambutan sangat melimpah.

Bakteri endofit merupakan organisme mikroskopis yang hidup secara berkoloni di dalam jaringan tumbuhan tanpa menyebabkan kerusakan pada tanaman inang. Bakteri endofit berperan dalam melindungi tanaman inang dari serangan patogen, sedangkan tanaman inang mampu menyediakan nutrisi yang dibutuhkan bakteri endofit (Abdallah *et al.*, 2019; Maulidia *et al.*, 2020; Soliha *et al.*, 2021; Verma *et al.*, 2019). Interaksi tersebut memberikan sifat mutualisme antara bakteri endofit dan tanaman inang (Kogel *et al.*, 2006). Adanya hubungan mutualisme tersebut menyebabkan terjadinya rekombinasi gen sehingga bakteri endofit mampu menghasilkan metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya (Abdallah *et al.*, 2019; Gouda *et al.*, 2016; Patil *et al.*, 2016; Sarjono *et al.*, 2019). Tallei *et al.*, (2020), menjelaskan jika metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri endofit mampu digunakan sebagai senyawa antibakteri. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Chigurupati *et al.*, (2019), daun rambutan diketahui memiliki bakteri endofit dengan jenis *Escherichia coli*. Suhandono *et al.*, (2016), juga menunjukkan bahwa buah rambutan diketahui memiliki bakteri endofit dengan genus *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Staphylococcus*, dan *Curtobacterium*.

Penelitian yang telah dilakukan oleh Pratiwi (2015), menyebutkan bahwa metabolit sekunder bakteri endofit daun rambutan yang diekstraksi menggunakan metode tanpa maserasi dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus subtilis*. Selain menggunakan metode tanpa maserasi, ekstraksi senyawa metabolit sekunder bakteri endofit dapat dilakukan dengan proses maserasi. Metode maserasi memiliki prinsip kerja secara difusi dan osmosis pada sampel saat dilakukan perendaman dengan pelarut. Kelebihan metode ini adalah proses yang sederhana dan ekonomis karena hanya membutuhkan wadah tertutup sebagai tempat ekstraksi, namun membutuhkan waktu yang lama dalam ekstraksi sehingga menjadi kelemahan dalam metode ini (Naviglio *et al.*, 2019; Tambun *et al.*, 2021).

Maserasi umumnya menggunakan pelarut organik seperti metanol, etanol, air, ataupun campuran dari beberapa pelarut (Cacique *et al.*, 2020; Utami dan Putri, 2020). Pemilihan jenis pelarut menjadi faktor penentu keberhasilan ekstraksi metabolit sekunder. Hammado dan Illing, (2013), menyebutkan bahwa suhu didih pelarut, daya kelarutan, mudah terbakar atau tidak, toksisitas pelarut,

dan ada pengaruh tidaknya pada alat ekstraksi menjadi beberapa faktor yang perlu diperhatikan dalam memilih pelarut. Menurut Kusbandari & Susanti (2017), metanol merupakan pelarut dengan sifat universal sehingga mampu melarutkan metabolit sekunder dengan sifat polar dan nonpolar seperti flavonoid, steroid, alkaloid, dan saponin.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian mengenai metode ekstraksi metabolit sekunder bakteri endofit daun rambutan yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri endofit dari daun rambutan serta menguji aktivitasnya sebagai antibakteri dengan dua metode ekstraksi metabolit sekunder yang berbeda untuk mengetahui metode ekstraksi yang paling efektif sebagai antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*.

METODE

Pengambilan Sampel Daun Rambutan dan Desain Penelitian

Pengambilan sampel daun rambutan dilakukan di wilayah Kecamatan Gunungpati tepatnya di Jl. Taman Siswa, Gg. Cempaka Sari Timur, RT 4/RW 1, Kelurahan Sekaran, Kota Semarang. Daun rambutan dipetik dengan kriteria berupa daun berumur muda, berwarna hijau, dan sehat. Penelitian dilaksanakan dalam waktu 6 bulan pada bulan Januari hingga Juni 2023 di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Negeri Semarang. Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor dengan 5 pengulangan pada masing-masing bakteri uji. Variabel bebas berupa variasi metode ekstraksi metabolit sekunder bakteri endofit daun rambutan. Variabel terikat yang didapatkan adalah diameter zona hambat dari metabolit sekunder bakteri endofit daun rambutan terhadap bakteri uji *E. coli* dan *B. subtilis*. Variabel kontrol berupa medium pertumbuhan bakteri NA (*Nutrient Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*) yang sudah ditambah nistatin sebagai antijamur.

Isolasi Bakteri Endofit Daun Rambutan

Daun rambutan diiris dengan potongan melintang menjadi ukuran 2x2 cm menggunakan pisau secara aseptis. Potongan daun rambutan kemudian dicuci bersih menggunakan air mengalir, selanjutnya dilakukan sterilisasi permukaan dengan perendaman menggunakan alkohol 70% selama 1 menit, kemudian natrium hipoklorit (NaOCl) 2% selama 5 menit, dan direndam kembali menggunakan alkohol 70% selama 30 detik. Potongan daun rambutan kemudian dibilas dengan perendaman menggunakan akuades steril sebanyak dua kali dengan waktu 1 menit untuk setiap perendaman akuades (Pratiwi, 2015). Potongan daun rambutan kemudian ditanam secara aseptis menggunakan pinset ke dalam media NA yang sudah ditambahkan nistatin dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C.

Pemurnian Bakteri Endofit Daun Rambutan

Koloni bakteri yang tumbuh di sekitar potongan daun rambutan dengan ciri morfologi yang berbeda diambil sebanyak 1 ose kemudian dilakukan sub kultur berulang pada media NA baru menggunakan metode *streak plate* hingga didapatkan kultur murni bakteri endofit (Sari *et al.*, 2020; Sharma & Mallubhotla, 2022; Sipriyadi *et al.*, 2022; Sulistiyani *et al.*, 2016; Tallei *et al.*, 2020). Isolat murni bakteri endofit kemudian diperbanyak pada cawan petri dengan metode *streak plate* sebagai *stock culture* dan pada agar miring dalam tabung reaksi sebagai *working culture*.

Identifikasi Bakteri Endofit Daun Rambutan

Identifikasi dilakukan pada isolat murni bakteri endofit daun rambutan hasil pemurnian yang mengacu pada *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Identifikasi dilakukan dengan pengamatan secara makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati koloni bakteri endofit yang tumbuh secara memisah dalam media NA meliputi parameter bentuk, ukuran, warna, tepian, elevasi, tekstur, *optical property*, dan kenampakan koloni. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan pengecatan Gram dan pengecatan endospora. Uji biokimia dilakukan dengan uji katalase menggunakan Hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% (Sadikin *et al.* 2021).

Regenerasi Bakteri Uji *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*

Isolat murni bakteri *E. coli* dan *B. subtilis* dari koleksi laboratorium Mikrobiologi FMIPA UNNES diambil sebanyak 1 ose kemudian dilakukan peremajaan pada media NA baru menggunakan metode *streak plate* lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil peremajaan bakteri *E. coli* dan *B. subtilis* kemudian dilakukan pengecatan Gram untuk memastikan sifat Gram dari masing-masing sel bakteri. Bakteri *E. coli* dan *B. subtilis* selanjutnya dilakukan perbanyak pada cawan petri menggunakan metode *streak plate* sebagai *stock culture* dan dibuat agar miring pada tabung reaksi sebagai *working culture*.

Ekstraksi Metabolit Sekunder Bakteri Endofit Daun Rambutan Tanpa Menggunakan Maserasi

Isolat murni bakteri endofit daun rambutan diremajakan pada media NA baru menggunakan metode *streak plate*. Setelah diremajakan, isolat bakteri endofit diambil sebanyak 1 ose dan dimasukkan ke dalam larutan NaCl fisiologis 0,9% 10 mL dan divortex hingga homogen, kemudian disamakan kekeruhannya dengan standar larutan McFarland 0,5 agar suspensi bakteri memiliki jumlah kepadatan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (Sari *et al.*, 2020). NaCl 0,9% 10 ml yang sudah berisi biakan bakteri endofit kemudian dimasukkan ke dalam media NB 100 mL dan diinkubasi menggunakan shaker inkubator selama 48 jam, 120 rpm, dan suhu 30°C (Rahman *et al.*, 2017; Rahman *et al.*, 2022).

Setelah dishaker selama 48 jam, ekstraksi senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan mengambil 2 mL kultur cair bakteri endofit ke dalam *tube centrifuge* 2 mL. Selanjutnya, dilakukan sentrifugasi menggunakan *centrifuge* pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C (Irma *et al.*, 2018; Rahman *et al.*, 2017; Rahman *et al.*, 2022; Sabu & Radhakrishnan, 2016). Supernatan bakteri endofit pada bagian atas yang sudah terpisah dengan *pellet* kemudian diambil menggunakan mikrotip steril dan dimasukkan ke dalam botol flakon steril (Sari *et al.*, 2020).

Ekstraksi Metabolit Sekunder Bakteri Endofit Daun Rambutan Menggunakan Maserasi Metanol 70%

Ekstraksi senyawa metabolit sekunder bakteri endofit daun rambutan menggunakan pelarut metanol 70% mengacu pada metode yang dilakukan oleh Nofiani *et al.* (2009) dan Pandiangan (2014). Isolat murni bakteri endofit daun rambutan diremajakan menggunakan metode *streak plate*. Setelah diremajakan isolat bakteri endofit diambil sebanyak 1 ose kemudian dimasukkan ke dalam larutan NaCl fisiologis 0,9% dan divortex. Kemudian kekeruhan bakteri disamakan dengan larutan McFarland 0,5 yang setara dengan kepadatan bakteri sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (Rahman *et al.*, 2022).

Suspensi bakteri endofit dalam NaCl 0,9% dioleskan secara merata pada media NA menggunakan *cotton bud* steril dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Setelah inkubasi, media NA dicacah kecil menggunakan pisau steril dan dimasukkan ke dalam pelarut metanol 70% 150 ml dalam erlenmeyer. Kemudian dilakukan maserasi selama 48 jam di dalam inkubator bakteri pada suhu 37°C. Setelah maserasi selama 48 jam, hasil maserasi kemudian disaring menggunakan kertas saring WhatmanTM untuk menghilangkan residu. Filtrat kemudian diambil sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam *tube centrifuge* 2 mL dan disentrifugasi selama 15 menit, 5000 rpm, dan suhu 4°C. Hasil supernatan yang terbentuk pada bagian atas dipindahkan ke dalam botol flakon steril, kemudian dilakukan penguapan metanol 70% menggunakan waterbath selama 1 jam dengan suhu 60°C (Dewi *et al.*, 2022).

Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dari metabolit sekunder bakteri endofit daun rambutan dilakukan menggunakan bakteri uji *E. coli* sebagai bakteri Gram negatif dan *B. subtilis* sebagai bakteri Gram positif. Bakteri uji diremajakan terlebih dahulu menggunakan metode *streak plate*. Setelah diremajakan, bakteri uji diambil sebanyak 1 ose kemudian diinokulasikan dalam larutan NaCl fisiologis 0,9% dan divortex hingga homogen. Suspensi bakteri uji kemudian disamakan kekeruhannya dengan larutan McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Selanjutnya, suspensi bakteri uji dioleskan menggunakan *cotton bud* steril pada media NA secara merata (Rahman *et al.*, 2022; Sari *et al.*, 2020; Sharma & Mallubhotla, 2022).

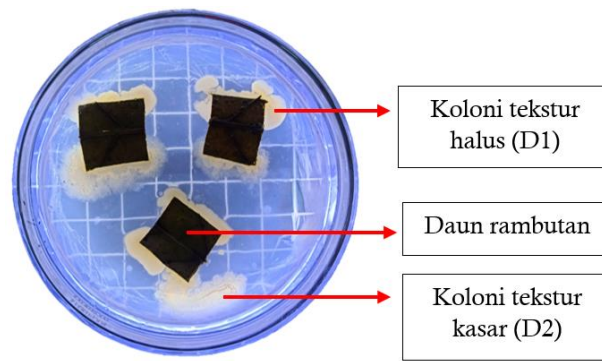
Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran (Tallei *et al.*, 2020). Media NA yang telah dioleskan secara merata bakteri uji kemudian dibuat sumuran secara aseptis menggunakan *cork borer* berdiameter 6 mm. Supernatan bakteri endofit dimasukkan pada lubang sumuran sebanyak 50 µl secara steril menggunakan mikropipet (Sulistiyani *et al.*, 2016). Kemudian sampel diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Mohamad *et al.*, 2018; Tallei *et al.*, 2020). Kontrol positif menggunakan *chloramphenicol* 2.5% dan kontrol negatif menggunakan akuades steril (Sulaiha *et al.*, 2022).

Keberadaan zona bening yang terbentuk disekitar sumuran menandakan adanya penghambatan pertumbuhan dari metabolit sekunder bakteri sekunder terhadap bakteri uji. Diameter zona hambat kemudian diukur menggunakan kaliper digital untuk menggolongkan kekuatan sifat antibakteri dari metabolit sekunder (Islam *et al.*, 2018; Sipriyadi *et al.*, 2022).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Endofit Daun Rambutan

Hasil isolasi bakteri endofit daun rambutan setelah diinkubasi selama 48 jam dapat diamati pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil isolasi bakteri endofit daun rambutan

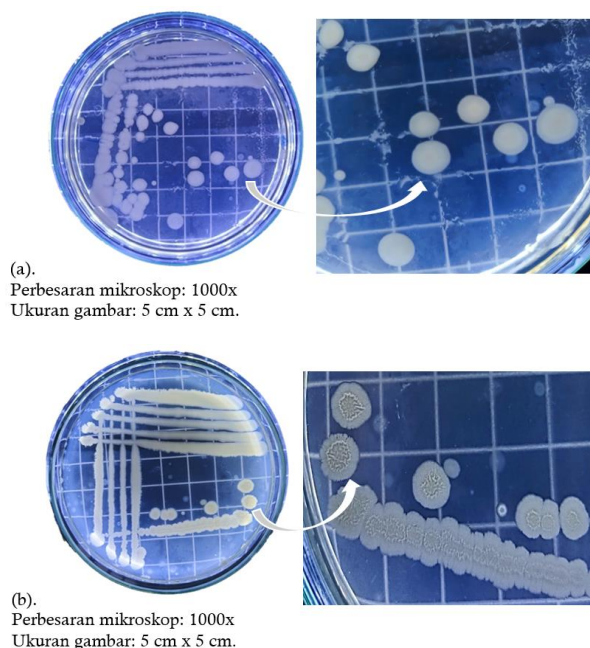
Pada Gambar 1 menunjukkan bahwa koloni bakteri tumbuh di sekitar area penanaman sampel potongan daun rambutan setelah diinkubasi selama 48 jam. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian Sadikin *et al.*, (2021), yang menunjukkan bahwa koloni bakteri endofit daun kelor tumbuh setelah dilakukan inkubasi selama 48 jam. Tidak adanya koloni bakteri yang tumbuh di luar area penanaman sampel dapat menjadikan bukti bahwa koloni bakteri yang tumbuh di sekitar area penanaman sampel merupakan bakteri endofit dari daun rambutan. Diperkuat oleh hasil dari beberapa penelitian seperti Anjum & Chandra, (2015); Beiranvand *et al.*, (2017); Putri *et al.*, (2018); Sadikin *et al.*, (2021); Vijayalakshmi *et al.*, (2016), yang memperlihatkan bahwa koloni bakteri endofit tumbuh pada area sekitar penanaman sampel setelah diinkubasi.

Koloni bakteri endofit daun rambutan yang tumbuh (Gambar 1) memperlihatkan dua jenis bakteri dengan ciri morfologi yang berbeda, yaitu tekstur halus dan kasar. Variasi jenis bakteri endofit dalam suatu tanaman umumnya tidak menentu, hal ini terjadi karena disebabkan oleh adanya beberapa faktor seperti genotip tanaman inang (Horton *et al.*, 2014; Walitang *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2021), jenis jaringan (Dai *et al.*, 2014), usia tanaman (Vendan *et al.*, 2010), lokasi tumbuh tanaman (González & Tello, 2011), kondisi kesehatan tanaman inang (Arnold *et al.*, 2003; Bogas *et al.*, 2015) dan keadaan lingkungan (Abdallah *et al.*, 2019; Pancher *et al.*, 2012) seperti musim (Sadeghi *et al.*, 2019), suhu, curah hujan (Arnold & Lutzoni, 2007; Fan *et al.*, 2020).

Adanya kriteria dalam pemilihan sampel daun dalam tahap isolasi juga menjadi penentu tingkat keanekaragaman jenis bakteri endofit. Pada penelitian ini digunakan sampel daun rambutan berumur muda, berwarna hijau, dan sehat. Penggunaan sampel daun berumur muda sejalan dengan hasil penelitian Fan *et al.*, (2020), yang menyatakan bahwa daun berumur muda diketahui memiliki keanekaragaman jenis mikroba endofit yang lebih besar daripada yang ditemukan pada daun berumur dewasa. Oono *et al.*, (2015), juga menambahkan diversitas mikroba endofit pada tanaman akan semakin menurun seiring bertambahnya usia tanaman. Penurunan jenis mikroba endofit tersebut disebabkan adanya perbedaan sifat fisiologis daun berumur muda dan dewasa, seperti perbedaan komposisi karbohidrat, fosfor, dan senyawa fenolik (Fan *et al.*, 2020; Kolton *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2014). Didukung oleh (Babu *et al.*, 2018), daun muda yang terdapat pada tanaman berumur muda memiliki kadar nutrisi yang signifikan lebih tinggi daripada daun muda yang terdapat pada tanaman berumur tua.

Identifikasi Bakteri Endofit Daun Rambutan

Bakteri endofit yang telah dimurnikan dengan subkultur berulang menggunakan metode *streak plate* selanjutnya diidentifikasi dengan pengamatan secara makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia. Hasil pemurnian bakteri endofit daun rambutan disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Isolat murni bakteri endofit daun rambutan. (a). Isolat D1 (Halus), dan (b). Isolat D2 (Kasar)

Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati morfologi koloni isolat murni bakteri endofit yang tumbuh secara memisah pada media NA. Berdasarkan pengamatan morfologi koloni dari kedua isolat murni bakteri endofit daun rambutan (Gambar 2) didapatkan data pengamatan makroskopis yang tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Morfologi koloni bakteri endofit daun rambutan

Parameter Pengamatan	Isolat D1	Isolat D2
Bentuk (<i>Shape</i>)	Bulat	Bulat
Warna (<i>Color</i>)	Putih kekuningan	Putih kelabu
Tepian (<i>Edge</i>)	Rata	Bergelombang
Elevasi (<i>Elevation</i>)	Datar	Cembung
Ukuran (<i>Size</i>)	Besar (6 mm)	Besar (5 mm)
Tekstur (<i>Texture</i>)	Halus	Kasar
<i>Optical property</i>	Buram	Buram
Kenampakan (<i>Appearance</i>)	Kusam	Kusam

Pengamatan mikroskopis dalam penelitian ini dilakukan dengan pengecatan Gram dan endospora. Uji biokimia dilakukan dengan uji katalase menggunakan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%. Hasil identifikasi secara mikroskopis dan uji biokimia tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakter sel bakteri endofit daun rambutan

Parameter Uji	Aspek Pengamatan Parameter	Hasil Pengamatan	
		Isolat D1	Isolat D2
Pengecatan Gram	Sifat Gram dan Bentuk sel	Gram positif (+) Batang panjang	Gram positif (+) Batang pendek
Pengecatan endospora	Keberadaan endospora	(+)	(+)
Uji katalase	Terbentuknya gelembung	(+)	(+)

Berdasarkan hasil pengamatan secara makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia, kedua isolat murni bakteri endofit daun rambutan diketahui memiliki kemiripan dengan genus *Bacillus* sp. Hal ini diperkuat oleh hasil beberapa penelitian, seperti Andalib *et al.*, (2016), bakteri genus *Bacillus* memiliki ciri morfologi koloni berbentuk bulat, elevasi datar, tepian rata, warna putih, tekstur halus, dan sel bakteri jenis Gram positif berbentuk batang. Suhandono *et al.*, (2016), buah rambutan kultivar binjai memiliki bakteri endofit jenis *B. tequilensis* dengan ciri morfologi koloni berwarna putih, bentuk bulat, tepian bergelombang, elevasi cembung, dan jenis Gram positif berbentuk batang.

Hasil penelitian Puspita *et al.*, (2017), melaporkan bahwa bakteri *Bacillus* memiliki morfologi dengan ciri bentuk bulat, warna putih, tepian rata, elevasi datar-cembung, terdapat endospora dan menghasilkan enzim katalase. Griffiths dan Schraft, (2017), menyebutkan bakteri *B. cereus* memiliki endospora dengan tipe *central-subterminal*, *elliptical*, dan dapat memproduksi enzim katalase. Ghosh *et al.*, (2002), jenis *B. circulans* memiliki morfologi koloni dengan elevasi cembung, tekstur kasar, tipe endospora *subterminal* dan *spherical*. Jenis *B. pumilus* bercirikan elevasi cembung, tekstur halus, tipe endospora *terminal* dan *elliptical* serta keduanya memiliki sel berbentuk batang dan mampu menghasilkan katalase

Uji Aktivitas Antibakteri dari Bakteri Endofit Daun Rambutan

Hasil uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan mengukur diameter vertikal dan horizontal dari zona bening yang terbentuk pada sekitar area sumuran menggunakan kaliper digital. Hasil pengukuran zona hambat disajikan pada Tabel 3 dan 4.

Tabel 3. Diameter zona hambat dari ekstraksi metabolit sekunder tanpa menggunakan maserasi

Bakteri Uji	Pengulangan	Diameter Zona Hambat (mm)			
		D1P1	D2P1	K+	K-
<i>Escherichia coli</i>	1	9.25	5.8	22.85	0
	2	8.1	5.9	22.25	0
	3	7.4	5.35	23	0
	4	9.3	5.1	23	0
	5	7.75	5.05	22.75	0
	Rerata$\pm$sd	8.36$\pm$0.8^c	5.44$\pm$0.3^b	22.7$\pm$0.3^d	0^a
<i>Bacillus subtilis</i>	1	6.15	9.5	28.1	0
	2	6.6	9.6	27.7	0
	3	6.55	10.1	27	0
	4	7.25	9.7	27.1	0
	5	7.05	10.5	27.1	0
	Rerata$\pm$sd	6.72$\pm$0.4^b	9.88$\pm$0.4^c	27.4$\pm$0.4^d	0^a

Keterangan: D1P1 (Isolat D1), D2P1 (Isolat D2), K+ (*Chloramphenicol* 2.5%), dan K- (Akuades steril).
Notasi a, b, c, d yang berbeda pada kolom rerata menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan berbeda nyata pada masing-masing bakteri uji berdasarkan uji Duncan dan notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata.

Tabel 4. Diameter zona hambat dari ekstraksi metabolit sekunder menggunakan maserasi metanol 70%

Bakteri Uji	Pengulangan	Diameter Zona Hambat (mm)			
		D1P2	D2P2	K+	K-
<i>Escherichia coli</i>	1	14.2	12.1	24.75	0
	2	12.65	11.9	25.6	0
	3	13.6	12.25	26.3	0
	4	12.9	11.55	25.15	0
	5	14.4	12.85	26.25	0
	Rerata±sd	13.55±0.7 ^c	12.13±0.4 ^b	25.61±0.6 ^d	0 ^a
<i>Bacillus subtilis</i>	1	16.6	20.55	27.75	0
	2	16.2	19.5	28	0
	3	15.05	18.65	29.55	0
	4	17.25	20	29.5	0
	5	16.25	19.75	28.1	0
	Rerata±sd	16.27±0.8 ^b	19.69±0.6 ^c	28.58±0.8 ^d	0 ^a

Keterangan: D1P2 (Isolat D1), D2P2 (Isolat D2), K+ (*Chloramphenicol* 2.5%), dan K- (Akuades steril).

Notasi a, b, c, d yang berbeda pada kolom rerata menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan berbeda nyata pada masing-masing bakteri uji berdasarkan uji Duncan dan notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata.

Berdasarkan Tabel 3 dan 4 menunjukkan bahwa kontrol positif (K+) berupa *chloramphenicol* 2.5% menghasilkan penghambatan paling optimal terhadap kedua bakteri uji *E. coli* dan *B. subtilis*. *Chloramphenicol* merupakan antibiotik berspektrum luas yang mampu menghambat sintesis protein pada bakteri. Mekanisme kerja *chloramphenicol* dijelaskan dengan mengikat reseptor 50S pada ribosom bakteri, pengikatan ini menyebabkan fungsi enzim transferase peptidil pada bakteri menjadi terhambat sehingga transfer asam amino ke peptida terhenti dan mengakibatkan penghambatan terbentuknya protein pada bakteri (Dinos *et al.*, 2016; Giannopoulou *et al.*, 2019; Joseph *et al.*, 2015).

Tabel 5. Rerata±sd diameter zona hambat dua metode ekstraksi terhadap bakteri uji

Bakteri Uji	Rerata±sd Diameter Zona Hambat (mm)			
	Ekstraksi Tanpa Maserasi		Ekstraksi Dengan Maserasi Metanol 70%	
	D1P1	D2P1	D1P2	D2P2
<i>Escherichia coli</i>	8.36±0.8 ^b	5.44±0.3 ^a	13.55±0.7 ^d	12.13±0.4 ^c
<i>Bacillus subtilis</i>	6.72±0.4 ^a	9.88±0.4 ^b	16.27±0.8 ^c	19.69±0.6 ^d

Keterangan: D1 (Isolat D1), D2 (Isolat D2), P1 (Ekstraksi tanpa maserasi), dan P2 (Ekstraksi dengan maserasi metanol 70%). Notasi a, b, c, d yang berbeda pada kolom masing-masing bakteri uji menunjukkan bahwa perlakuan metabolit sekunder dari kedua metode ekstraksi yang diberikan berbeda nyata pada masing-masing bakteri uji berdasarkan uji Duncan dan notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata.

Berdasarkan rerata diameter zona hambat yang tertera pada Tabel 5 diketahui bahwa metode ekstraksi metabolit sekunder menggunakan maserasi metanol 70% memiliki penghambatan lebih optimal pada bakteri uji *E. coli* dan *B. subtilis* daripada metode tanpa maserasi. Metanol merupakan pelarut universal yang dapat melarutkan senyawa polar, semipolar bahkan nonpolar (Kusbandari & Susanti, 2017; Suryani *et al.*, 2015). Tingkat kepolaran pelarut juga ditentukan oleh adanya nilai konstanta dielektrik pelarut, konstanta dielektrik dapat diartikan sebagai aksi saling menolak dari dua partikel bermuatan listrik dalam suatu senyawa (Verdiana *et al.*, 2018). Metanol sebagai pelarut universal diketahui memiliki konstanta dielektrik sebesar 32,6 (Masegi *et al.*, 2020), sehingga metanol mampu

mengekstraksi senyawa golongan flavonoid, steroid, alkaloid, saponin, tanin, fenol, dan terpenoid pada suatu komponen (Dewi *et al.*, 2022; Kusbandari & Susanti, 2017).

Bakteri endofit diketahui dapat mensekresikan metabolit sekunder yang serupa dengan tanaman inangnya (Abdallah *et al.*, 2019; Gouda *et al.*, 2016; Patil *et al.*, 2016; Sarjono *et al.*, 2019). Daun rambutan diketahui dapat memproduksi berbagai senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, fenol, terpenoid, steroid (Chigurupati *et al.*, 2019; de Santana Santos *et al.*, 2021; Pratiwi, 2015; Putri *et al.*, 2021; Sulistyaningsih *et al.*, 2017). Sehingga dapat diketahui bahwa senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam isolat murni bakteri endofit daun rambutan dapat diekstraksi secara penuh selama proses maserasi menggunakan pelarut metanol 70%.

Senyawa flavonoid memiliki tiga mekanisme kerja sebagai antibakteri, yaitu melenyapkan bakteri secara langsung, bersinergi pada pengaktifan antibiotik, serta melemahkan tingkat patogenitas bakteri (Xie *et al.*, 2015). Cushnie & Lamb, (2011), juga menambahkan senyawa flavonoid sebagai antibakteri dapat memproduksi hidrogen peroksida yang berfungsi dalam menghancurkan membran sitoplasma pada bakteri, memperlambat kerja enzim topoisomerase dalam sintesis asam nukleat, menghambat kinerja ATP sintase sehingga metabolisme energi bakteri terhambat, serta menghambat sintesis dinding dan membran sel pada bakteri. Peran steroid sebagai antibakteri dengan berikatan pada membran lipid sehingga mengakibatkan kebocoran sel pada lisosom bakteri (Shinde & Mulay, 2015). Saponin dapat berasosiasi dengan kolesterol membran sel bakteri, kemudian membentuk pori-pori yang menyebabkan membran sel pecah (Amaha *et al.*, 2022). Sejalan dengan hasil penelitian Dong *et al.* (2020), menunjukkan bahwa aktivitas saponin dapat menyebabkan kerusakan pada dinding sel, membran, sitoplasma, protein membran yang memicu kebocoran sel bakteri.

Senyawa fenol diketahui mampu menyebabkan degradasi membran luar, mengubah sifat permeabilitas, muatan, transfer ion, dan komposisi molekul pada dinding sel bakteri (Carvalho *et al.*, 2018; Rattanata *et al.*, 2016). Tanin memiliki tiga mekanisme dalam penghambatan pertumbuhan bakteri, pertama tanin mampu menarik molekul besi disekitarnya, sehingga bakteri akan mengalami kondisi defisiensi molekul besi. Kondisi ini mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan bakteri. Kedua, tanin mampu memperlambat proses sintesis enzim pembentuk dinding sel bakteri. Ketiga, secara khusus tanin mampu melekat dan meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri, akibatnya senyawa antibakteri mudah menembus masuk ke dalam sel bakteri (Farha *et al.*, 2020).

Alkaloid memiliki beberapa mekanisme sebagai antibakteri, seperti menghambat sintesis asam nukleat dan protein bakteri, mengubah sifat permeabilitas membran sel, mendegradasi dinding sel, mengganggu metabolisme bakteri, serta menghambat siklus *efflux* pada bakteri (Yan *et al.*, 2021). Selanjutnya, senyawa terpenoid bersifat bakteriositik karena dapat mendegradasi dinding sel dengan menyebabkan ketidakstabilan pada struktur sel bakteri, menghambat aktivitas pembentukan ATP dan sistem transport pada bakteri (Ergüden, 2021). Dilaporkan oleh Alibi *et al.*, (2021), bahwa terpenoid mampu menghambat metabolisme glutamat dan aspartat yang menyebabkan berubahnya jalur fotorespirasi dan fotosintesis pada bakteri.

Adanya perbedaan ukuran diameter zona hambat yang terbentuk pada bakteri uji (Tabel 5), menunjukkan bahwa terdapat perbedaan komposisi struktur antara bakteri *E. coli* (Gram negatif) dan *B. subtilis* (Gram positif). Bakteri Gram negatif memiliki membran luar yang terusun atas lipopolisakarida (Iguchi *et al.*, 2015). Krishnamoorthy *et al.*, (2016); Nikaido, 2003; Nikaido & Pagès, (2012); Zgurskaya *et al.*, (2015), melaporkan bahwa lapisan ini memiliki fungsi dalam menghalangi masuknya senyawa hidrofilik ataupun hidrofobik yang bersifat antibiotik. Sehingga, kehadiran lapisan lipopolisakarida menyebabkan bakteri Gram negatif lebih bersifat resisten terhadap senyawa antibiotik. Sementara itu, bakteri Gram positif memiliki komposisi penyusun dinding sel berupa lapisan peptidoglikan, asam teikoat, dan protein (Wang *et al.*, 2021). Lapisan peptidoglikan pada bakteri Gram positif tersusun atas karbohidrat dan protein, dimana kedua molekul tersebut memiliki sifat polar (Dewi *et al.*, 2022). Akibatnya, metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat murni bakteri endofit daun rambutan yang merupakan senyawa polar akan lebih mudah berdifusi masuk ke dalam sel bakteri Gram positif (*B. subtilis*). Sejalan dengan prinsip *like dissolves like* yang menyebutkan bahwa molekul bersifat polar akan mudah larut dan berikatan dengan senyawa bersifat polar lainnya dan sebaliknya (Ali *et al.*, 2015; Breil *et al.*, 2017).

Berdasarkan hasil pengujian antibakteri yang telah dilakukan, kekuatan penghambatan metabolit sekunder yang diekstraksi menggunakan dua metode berbeda dan diujikan terhadap bakteri *E. coli* dan *B. subtilis* dapat dikategorikan menurut Fajeriyati & Andika, (2017), bahwa pada metode ekstraksi metabolit sekunder tanpa menggunakan maserasi isolat D1 dan D2 memiliki penghambatan yang sedang pada kedua bakteri uji, dimana pada *E. coli* sebesar 8.36 mm dan 5.44 mm, serta pada *B. subtilis* sebesar 6.72 mm dan 9.88 mm. Pada metode ekstraksi metabolit sekunder menggunakan maserasi metanol 70% isolat D1 dan D2 menunjukkan penghambatan yang kuat pada kedua bakteri uji, dimana pada *E. coli* sebesar 13.55 mm dan 12.13 mm, serta pada *B. subtilis* sebesar 16.27 mm dan 19.69 mm.

SIMPULAN

Isolasi bakteri endofit daun rambutan menunjukkan hasil dua jenis koloni yang berbeda dengan ciri morfologi koloni kasar dan halus. Hasil identifikasi secara makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia menunjukkan bahwa kedua isolat murni bakteri endofit daun rambutan memiliki kemiripan dengan genus *Bacillus* sp. Hasil uji antibakteri menunjukkan bahwa ekstraksi metabolit sekunder menggunakan maserasi pelarut metanol 70% lebih efektif sebagai antibakteri *E. coli* dan *B. subtilis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah, R. A. Ben, Jabnoun-Khiareddine, H., & Daami-Remadi, M. (2019). Exploring the beneficial endophytic microorganisms for plant growth promotion and crop protection: Elucidation of some bioactive secondary metabolites involved in both effects. In *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms: Discovery and Applications*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_16
- Afzaal, M., Saeed, F., Bibi, M., Ejaz, A., Shah, Y. A., Faisal, Z., Ateeq, H., Akram, N., Asghar, A., & Shah, M. A. (2023). Nutritional, pharmaceutical, and functional aspects of rambutan in industrial perspective: An updated review. *Food Science and Nutrition*, February, 1–11. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3379>

- Ahmad, I., & Chua, P. C. (2013). Trends in production and trade of tropical fruits in ASEAN countries. *Acta Horticulturae*, 975, 559–580. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.975.73>
- Ali, U., Karim, K. J. B. A., & Buang, N. A. (2015). A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). *Polymer Reviews*, 55(4), 678–705. <https://doi.org/10.1080/15583724.2015.1031377>
- Alibi, S., Crespo, D., & Navas, J. (2021). Plant-derivatives small molecules with antibacterial activity. *Antibiotics*, 10(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030231>
- Amaha, N. D., Mebrahtu, S. G., & Abdu, N. (2022). Saponins and their synergistic antibacterial activity with traditional antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: Review. *Qeios*, November, 1–14. <https://doi.org/10.32388/YO91ZE>
- Andalib, R., Majid, M. Z. A., Hussin, M. W., Ponraj, M., Keyvanfar, A., Mirza, J., & Lee, H. S. (2016). Optimum concentration of *Bacillus megaterium* for strengthening structural concrete. *Construction and Building Materials*, 118, 180–193. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2016.04.142>
- Anjum, N., & Chandra, R. (2015). Endophytic bacteria: Optimizaton of isolation procedure from various medicinal plants and their preliminary characterization. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(4), 233–238.
- Arnold, A. Elizabeth, & Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88(3), 541–549. <https://doi.org/10.1890/05-1459>
- Arnold, A E, Mejia, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15649–15654.
- Babu, A. K., Kumaresan, G., Raj, V. A. A., & Velraj, R. (2018). Review of leaf drying: Mechanism and influencing parameters, drying methods, nutrient preservation, and mathematical models. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 536–556. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.002>
- Beiranvand, M., Amin, M., Hashemi-Shahraki, A., Romani, B., Yaghoubi, S., & Sadeghi, P. (2017). Antimicrobial activity of endophytic bacterial populations isolated from medical plants of Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 9(1), 11–18.
- Bogas, A. C., Ferreira, A. J., Araújo, W. L., Astolfi-Filho, S., Kitajima, E. W., Lacava, P. T., & Azevedo, J. L. (2015). Endophytic bacterial diversity in the phyllosphere of Amazon *Paullinia cupana* associated with asymptomatic and symptomatic anthracnose. *SpringerPlus*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1037-0>
- Breil, C., Vian, M. A., Zemb, T., Kunz, W., & Chemat, F. (2017). “Bligh and Dyer” and Folch methods for solid–liquid–liquid extraction of lipids from microorganisms. Comprehension of solvation mechanisms and towards substitution with alternative solvents. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms18040708>
- Cacique, A. P., Barbosa, É. S., de Pinho, G. P., & Silvério, F. O. (2020). Maceration extraction conditions for determining the phenolic compounds and the antioxidant activity of *catharanthus roseus* (L.) g. don. *Ciencia e Agrotecnologia*, 44, 1–12. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202044017420>
- Carvalho, R. S., Carollo, C. A., de Magalhães, J. C., Palumbo, J. M. C., Boaretto, A. G., Nunes e Sá, I. C., Ferraz, A. C., Lima, W. G., de Siqueira, J. M., & Ferreira, J. M. S. (2018). Antibacterial and antifungal activities of phenolic compound-enriched ethyl acetate fraction from *Cochlospermum regium* (mart. Et. Schr.) Pilger roots: Mechanisms of action and synergism with tannin and gallic acid. *South African Journal of Botany*, 114, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.11.010>
- Chai, K. F., Chang, L. S., Adzahan, N. M., Karim, R., Rukayadi, Y., & Ghazali, H. M. (2019). Physicochemical properties and toxicity of cocoa powder-like product from roasted seeds of fermented rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) fruit. *Food Chemistry*, 271, 298–308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.155>
- Chigurupati, S., Vijayabalan, S., Karunanidhi, A., Krishnan Selvarajan, K., Nanda, S. S., & Satpathy, R. (2019). Antidiabetic, antioxidant and in silico studies of bacterial endosymbiont inhabiting *Nephelium lappaceum* L. . *Ovidius University Annals of Chemistry*, 30(2), 95–100. <https://doi.org/10.2478/auoc-2019-0017>
- Chigurupati, S., Vijayabalan, S., Selvarajan, K. K., Hashish, N. E., Mani, V., Ahmed, E. S., & Das, S. (2019). Identification of *Nephelium lappaceum* leaves phenolic and flavonoid component with radical scavenging, antidiabetic and antibacterial potential. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 18(2), 360–365.
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties

- of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014>
- Dai, J. X., Liu, X. M., & Wang, Y. J. (2014). Diversity of endophytic bacteria in *Caragana microphylla* grown in the desert grassland of the Ningxia Hui Autonomous Region of China. *Genetics and Molecular Research*, 13(2), 2349–2358. <https://doi.org/10.4238/2014.April.3.7>
- de Santana Santos, A., de Souza Oliveira, A. K., Pereira, R. O., Junior, E. V. B., de Lima Sayão, A., & de Oliveira e Silva, A. M. (2021). Composition and Biological Properties of Rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Phytopharmaceuticals: Potential Therapeutic Applications*, 403–436. <https://doi.org/10.1002/9781119682059.ch21>
- Dewi, P., Putri, A. R., Bintari, S. H., & Mubarak, I. (2022). Uji Efektivitas Ekstrak Buah Ketapang (*Terminalia catappa*) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. *Life Science*, 8(1), 18–24. <http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/LifeSci>
- Dinos, G. P., Athanassopoulos, C. M., Missiri, D. A., Giannopoulou, P. C., Vlachogiannis, I. A., Papadopoulos, G. E., Papaioannou, D., & Kalpaxis, D. L. (2016). Chloramphenicol derivatives as antibacterial and anticancer agents: Historic problems and current solutions. *Antibiotics*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics5020020>
- Dong, S., Yang, X., Zhao, L., Zhang, F., Hou, Z., & Xue, P. (2020). Antibacterial activity and mechanism of action saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. husks against foodborne pathogenic bacteria. *Industrial Crops and Products*, 149(August 2019), 112350. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112350>
- Ergüden, B. (2021). Phenol group of terpenoids is crucial for antibacterial activity upon ion leakage. *Letters in Applied Microbiology*, 73(4), 438–445. <https://doi.org/10.1111/lam.13529>
- Fajeriati, N., & Andika. (2017). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Rimpang Kencur (*Kaempferia galanga* L) pada Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*. *Journal of Current Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 36–41.
- Fan, Y., Gao, L., Chang, P., & Li, Z. (2020). Endophytic fungal community in grape is correlated to foliar age and domestication. *Annals of Microbiology*, 70(1), 4–11. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01574-9>
- Farha, A. K., Yang, Q. Q., Kim, G., Li, H. Bin, Zhu, F., Liu, H. Y., Gan, R. Y., & Corke, H. (2020). Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience*. (38) 100751. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100751>
- Ghosh, K., Ray, A. K., & Sen, S. K. (2002). Characterization of bacilli isolated from the gut of rohu, labeo rohita, fingerlings and its significance in digestion. *Journal of Applied Aquaculture*, 12(3), 33–42. https://doi.org/10.1300/J028v12n03_04
- Giannopoulou, P. C., Missiri, D. A., Kournoutou, G. G., Sazakli, E., Papadopoulos, G. E., Papaioannou, D., Dinos, G. P., Athanassopoulos, C. M., & Kalpaxis, D. L. (2019). New chloramphenicol derivatives from the viewpoint of anticancer and antimicrobial activity. *Antibiotics*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8010009>
- González, V., & Tello, M. L. (2011). The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*, 47, 29–42. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0073-x>
- Gouda, S., Das, G., Sen, S. K., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2016). Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01538>
- Griffiths, M. W., & Schraft, H. (2017). *Bacillus cereus* Food Poisoning. In *Foodborne Diseases: Third Edition* (Third Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00020-6>
- Hammado, N., & Illing, I. (2013). Identifikasi Senyawa Bahan Aktif Alkaloid Pada Tanaman Lahuna (*Eupatorium odoratum*). *Jurnal Dinamika*, 04(2), 1–18.
- Horton, M. W., Bodenhausen, N., Beilsmith, K., Meng, D., Muegge, B. D., Subramanian, S., Vetter, M. M., Vilhjálmsson, B. J., Nordborg, M., Gordon, J. I., & Bergelson, J. (2014). Genome-wide association study of *Arabidopsis thaliana* leaf microbial community. *Nature Communications*, 5(May), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms6320>
- Iguchi, A., Iyoda, S., Kikuchi, T., Ogura, Y., Katsura, K., Ohnishi, M., Hayashi, T., & Thomson, N. R. (2015). A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Research*, 22(1), 101–107. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu043>
- Irma, A., Meryandini, A., & Rupaedah, B. (2018). Biofungicide producing bacteria: An in vitro inhibitor of *Ganoderma boninense*. *HAYATI Journal of Biosciences*, 25(4), 151–159.

<https://doi.org/10.4308/hjb.25.4.151>

- Islam, N., Choi, J., & Baek, K. H. (2018). Antibacterial Activities of Endophytic Bacteria Isolated from *Taxus brevifolia* Against Foodborne Pathogenic Bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(5), 269–276. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2357>
- Jahurul, M. H. A., Azzatul, F. S., Sharifudin, M. S., Norliza, M. J., Hasmadi, M., Lee, J. S., Patricia, M., Jinap, S., Ramlah George, M. R., Firoz Khan, M., & Zaidul, I. S. M. (2020). Functional and nutritional properties of rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) seed and its industrial application: A review. *Trends in Food Science and Technology*, (99), 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.016>
- Joseph, M. R. P., Al-Hakami, A. M., Assiry, M. M., Jamil, A. S., Assiry, A. M., Shaker, M. A., & Hamid, M. E. (2015). In vitro anti-yeast activity of chloramphenicol: A preliminary report. *Journal de Mycologie Medicale*, 25(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.10.019>
- Kogel, K. H., Franken, P., & Hückelhoven, R. (2006). Endophyte or parasite - what decides? *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.001>
- Kolton, M., Graber, E. R., Tsehansky, L., Elad, Y., & Cytryn, E. (2017). Biochar-stimulated plant performance is strongly linked to microbial diversity and metabolic potential in the rhizosphere. *New Phytologist*, 213(3), 1393–1404. <https://doi.org/10.1111/nph.14253>
- Krishnamoorthy, G., Wolloscheck, D., Weeks, J. W., Croft, C., Rybenkov, V. V., & Zgurskaya, H. I. (2016). Breaking the permeability barrier of *Escherichia coli* by controlled Hyperporination of the outer membrane. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(12), 7372–7381. <https://doi.org/10.1128/AAC.01882-16>
- Kusbandari, A., & Susanti, H. (2017). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of methanol extract of *Maranta arundinacea* L fresh leaf and tuber. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 259(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/259/1/012010>
- Lin, X., Tfaily, M. M., Steinweg, J. M., Chanton, P., Esson, K., Yang, Z. K., Chanton, J. P., Cooper, W., Schadt, C. W., & Kostka, J. E. (2014). Microbial community stratification linked to utilization of carbohydrates and phosphorus limitation in a Boreal Peatland at Marcell Experimental Forest, Minnesota, USA. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(11), 3518–3530. <https://doi.org/10.1128/AEM.00205-14>
- Lisdiana, & Dewi, F. K. (2017). Effects of Rambutan Peel Extract to The Number of Erythrocytes and Haemoglobin in Rats Exposed to Cigarette Smoke. *Journal of Physics: Conference Series*, 755(1), 2–8. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/755/1/011001>
- Masegi, J. M. G., Puspawati, G. A. K. D., & Wiadnyani, A. A. I. S. (2020). Pengaruh Jenis Pelarut terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri* L.). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 9(4), 458. <https://doi.org/10.24843/itepa.2020.v09.i04.p10>
- Maulidia, V., Soesanto, L., Syamsuddin, Khairan, K., Hamaguchi, T., Hasegawa, K., & Sriwati, R. (2020). Secondary metabolites produced by endophytic bacteria against the root-knot nematode (*Meloidogyne* sp.). *Biodiversitas*, 21(11), 5270–5275. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d211130>
- Mohamad, O. A. A., Li, L., Ma, J. B., Hatab, S., Xu, L., Guo, J. W., Rasulov, B. A., Liu, Y. H., Hedlund, B. P., & Li, W. J. (2018). Evaluation of the antimicrobial activity of endophytic bacterial populations from Chinese traditional medicinal plant licorice and characterization of the bioactive secondary metabolites produced by *Bacillus atrophaeus* Against *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00924>
- Naviglio, D., Scarano, P., Ciaravolo, M., & Gallo, M. (2019). Rapid solid-liquid dynamic extraction (RSLDE): A powerful and greener alternative to the latest solid-liquid extraction techniques. *Foods*, 8(7), 1–22. <https://doi.org/10.3390/foods8070245>
- Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.4.593-656.2003>
- Nikaido, H., & Pagès, J. M. (2012). Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 340–363. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00290.x>
- Nofiani, R., Nurbetty, S., & Sapar, A. (2009). *AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK METANOL BAKTERI BERASOSIASI SPONS DARI PULAU LEMUKUTAN, KALIMANTAN BARAT*. 1(2), 33–41.
- Oono, R., Lefevre, E., Simha, A., & Lutzoni, F. (2015). A comparison of the community diversity of foliar fungal endophytes between seedling and adult loblolly pines (*Pinus taeda*). *Fungal Biology*,

119(10), 917–928.

- Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P. E., Longa, C. M. O., Yousaf, S., Pertot, I., & Campisano, A. (2012). Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera* L.) Respond to crop management. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4308–4317. <https://doi.org/10.1128/AEM.07655-11>
- Pandiangan, F. S., Biologi, D., Matematika, F., Ilmu, D. A. N., Alam, P., & Utara, U. S. (2014). *Isolasi dan Uji Ekstrak Metanol Bakteri Endofit Tapak Dara (Catharanthus Roseus) dalam Menghambat Pertumbuhan Beberapa Mikroba Patogen* [Doctoral dissertation, Universitas Sumatera Utara].
- Patil, R. H., Patil, M. P., & Maheshwari, V. L. (2016). Bioactive Secondary Metabolites From Endophytic Fungi: A Review of Biotechnological Production and Their Potential Applications. *Studies in Natural Products Chemistry*, 49(December), 189–205. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63601-0.00005-3>
- Pratiwi, B. E. (2015). *Isolasi dan Skrining Fitokimia Bakteri Endofit dari Daun Rambutan (Nephelium lappaceum L.) yang Berpotensi Sebagai Antibakteri*. [Thesis, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta]. Campus Repository. <https://repository.uinjkt.ac.id/dspace/bitstream/123456789/36992/1/Brasti%20Eka%20Pratiwi-FKIK.pdf>
- Puspita, F., Ali, M., & Pratama, R. (2017). Isolasi dan Karakterisasi Morfologi dan Fisiologi Bakteri Bacillus sp. Endofitik dari Tanaman Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Isolation and Characterization of Morphology and Physiology of Endophytic Bacillus sp. from Oil Palm Plants (*Elaeis guinee*. *J. Agrotek. Trop*, 6(2), 44–49.
- Putri, M. F., Fifendy, M., & Putri, D. H. (2018). Diversitas Bakteri Endofit Pada Daun Muda Dan Tua Tumbuhan Muda. *Eksakta*, 19(1).
- Putri, R., Supriyanta, J., & Adhil, D. A. (2021). Formulasi dan Uji Aktivitas Sediaan Masker Gel Peel Off Ekstrak Etanol 70% Daun Rambutan (*Nephelium Lappaceum* L.) Terhadap Propionibacterium Acnes. *Journal of Pharmaceutical and Health Research*, 2(1), 12–20. <https://doi.org/10.47065/jharma.v2i1.836>
- Rahman, L., Mukhtar, A., Ahmad, S., Rahman, L., Ali, M., Saeed, M., & Shinwari, Z. K. (2022). Endophytic bacteria of *Fagonia indica* Burm. F revealed to harbour rich secondary antibacterial metabolites. *PLoS ONE*, 17(12 December), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277825>
- Rahman, L., Shinwari, Z. K., Iqar, I., Rahman, L., & Tanveer, F. (2017). An assessment on the role of endophytic microbes in the therapeutic potential of *Fagonia indica*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0228-7>
- Rattanata, N., Klaynongsruang, S., Leelayuwat, C., Limpaboon, T., Lulitanond, A., Boonsiri, P., Chio-Srichan, S., Soontaranon, S., Rugmai, S., & Daduang, J. (2016). Gallic acid conjugated with gold nanoparticles: Antibacterial activity and mechanism of action on foodborne pathogens. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 3347–3356. <https://doi.org/10.2147/IJN.S109795>
- Sabu, R., & Radhakrishnan, E. K. (2016). Bioprospecting of Endophytic Bacteria from *Zingiber officinale* with Antibacterial Activities. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(9), 462–467. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.509.050>
- Sadeghi, F., Samsampour, D., Seyahooei, M. A., Bagheri, A., & Soltani, J. (2019). Diversity and Spatiotemporal Distribution of Fungal Endophytes Associated with *Citrus reticulata* cv. Siyadoo. *Current Microbiology*, 76(3), 279–289. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01632-9>
- Sadikin, N. A. N., Bintari, S. H., Widiatningrum, T., & Dewi, P. (2021). Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Aktivitas Antibakteri dari Bakteri Endofit Daun Kelor (*Moringa oleifera*). *Life Science*, 10(2), 109–119. <https://doi.org/10.15294/lifesci.v10i2.54441>
- Sari, S. A., Pujiyanto, S., & Supriyadi, A. (2020). Antibacterial activity tests of isolate endophytic bacteria from the tea plant (*Camellia sinensis*) againsts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Physics: Conference Series*, 1524(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1524/1/012067>
- Sarjono, P. R., Putri, L. D., Budiarti, C. E., Mulyani, N. S., Ngadiwiyana, Ismiyarto, Kusriani, D., & Adiwibawa Prasetya, N. B. (2019). Antioxidant and antibacterial activities of secondary metabolite endophytic bacteria from papaya leaf (*Carica papaya* L.). *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 509(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/509/1/012112>
- Sharma, M., & Mallubhotla, S. (2022). Diversity, Antimicrobial Activity, and Antibiotic Susceptibility Pattern of Endophytic Bacteria Sourced From *Cordia dichotoma* L. *Frontiers in Microbiology*, 13(May), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.879386>
- Shinde, A. B., & Mulay, Y. (2015). Phytochemical Analysis and Antibacterial Properties of Some Selected Indian Medicinal Plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(2), 228–235.
- Sipriyadi, Masrukhin, Wibowo, R. H., Darwis, W., Yudha, S., Purnaningsih, I., & Siboro, R. (2022).

- Potential Antimicrobe Producer of Endophytic Bacteria from Yellow Root Plant (*Arcangelisia flava* (L.)) Originated from Enggano Island. *International Journal of Microbiology*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6435202>
- Soliha, A. M., Heliawati, L., & Warnasih, S. (2021). Identification of Antibacterial Compounds From Endophytic Bacterial Extract of Green Grass Cincau Plant (*Premna Oblongifolia* Merr). *Helium: Journal of Science and Applied Chemistry*, 1(2), 46–50. <https://doi.org/10.33751/helium.v1i2.4538>
- Suhandono, S., Kusumawardhani, M. K., & Aditiawati, P. (2016). Isolation and Molecular Identification of Endophytic Bacteria From Rambutan Fruits (*Nephelium lappaceum* L.) Cultivar Binjai. *HAYATI Journal of Biosciences*, 23(1), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2016.01.005>
- Sulaiha, Mustikaningtyas, Widiatningrum, & Dewi. (2022). Senyawa Bioaktif *Trichoderma erinaceum* dan *Trichoderma koningiopsis* Serta Potensinya Sebagai Antibakteri. *Life Science*, 11(2), 120–131.
- Sulistiyan, S., Ardyati, T., & Winarsih, S. (2016). Antimicrobial and Antioxidant Activity of Endophyte Bacteria Associated with *Curcuma longa* Rhizome. *The Journal of Experimental Life Sciences*, 6(1), 45–51. <https://doi.org/10.21776/ub.jels.2016.006.01.11>
- Sulistiyaningsih, S., S, N., Wicaksono, I., & Budiman, A. (2017). Antibacterial activity of ethanol extract and fraction of Rambutan leaf (*Nephelium lappaceum*) against *Pseudomonas aeruginosa* multiresistant. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 7(11), 1. <https://doi.org/10.5455/njppp.2017.7.0935926102017>
- Suryani, N. C., Permana, D. G. M., & Jambe, A. A. G. N. A. (2015). Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Kandungan Total Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Matoa (*Pometia pinnata*). *Journal of the Japanese Society of Pediatric Surgeons*, 18(2), 33–37. <https://ojs.unud.ac.id/index.php/itepa/article/view/22645>
- Tallei, T. E., Linelejan, Y. T., Umboh, S. D., Adam, A. A., Muslem, & Idroes, R. (2020). Endophytic Bacteria isolated from the leaf of Langusei (*Ficus minahassae* Tesym. & de Vr.) and their antibacterial activities. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 796(1), 5–12. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/796/1/012047>
- Tambun, R., Alexander, V., & Ginting, Y. (2021). Performance comparison of maceration method, soxhletation method, and microwave-assisted extraction in extracting active compounds from soursop leaves (*Annona muricata*): A review. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1122(1), 012095. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/1122/1/012095>
- Utami, L. A., & Putri, D. H. (2020). The Effect of Ethanol Solvent Concentration on Antimicrobial Activities The Extract of Andalas Endophytic Bacteria (*Morus Macrourea* Miq.) Fermentation Product. *Eksakta : Berkala Ilmiah Bidang MIPA*, 21(1), 1–6. <https://doi.org/10.24036/eksakta/vol21-iss1/210>
- Vendan, R. T., Yu, Y. J., Lee, S. H., & Rhee, Y. H. (2010). Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. *Journal of Microbiology*, 48(5), 559–565. <https://doi.org/10.1007/s12275-010-0082-1>
- Verdiana, M., Widarta, I. W. R., & Permana, I. D. G. M. (2018). Pengaruh Jenis Pelarut pada Ekstraksi Menggunakan Gelombang Ultrasonik Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Lemon (*Citrus limon* (Linn.) Burm F.). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 7(4), 213. <https://doi.org/10.24843/itepa.2018.v07.i04.p08>
- Verma, S. K., Kharwar, R. N., Gond, S. K., Kingsley, K., & White, J. F. (2019). Exploring Endophytic Communities of Plants: Methods for Assessing Diversity, Effects on Host Development and Potential Biotechnological Applications. In *Seed Endophytes: Biology and Biotechnology* (Issue April). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4>
- Vijayalakshmi, R., Kairunnisa, K., Sivvaswamy, N., Dharan, S. S., & Natarajan, S. (2016). Enzyme production and antimicrobial activity of endophytic bacteria isolated from medicinal plants. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(14). <https://doi.org/10.17485/ijst/2016/v9i14/83143>
- Walitang, D. I., Kim, C. G., Kim, K., Kang, Y., Kim, Y. K., & Sa, T. (2018). The influence of host genotype and salt stress on the seed endophytic community of salt-sensitive and salt-tolerant rice cultivars. *BMC Plant Biology*, 18(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1261-1>
- Wang, M., Li, Z., Zhang, Y., Li, Y., Li, N., Huang, D., & Xu, B. (2021). Interaction with teichoic acids contributes to highly effective antibacterial activity of graphene oxide on Gram-positive bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 412(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125333>
- Wu, W., Chen, W., Liu, S., Wu, J., Zhu, Y., Qin, L., & Zhu, B. (2021). Beneficial Relationships Between

- Endophytic Bacteria and Medicinal Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.646146>
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., & Ren, L. (2015). Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), 132–149. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140916113443>
- Yan, Y., Li, X., Zhang, C., Lv, L., Gao, B., & Li, M. (2021). Research progress on antibacterial activities and mechanisms of natural alkaloids: A review. *Antibiotics*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030318>
- Zgurskaya, H. I., López, C. A., & Gnanakaran, S. (2015). Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches to Bypass It. *ACS Infectious Diseases*, 1(11), 512–522. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00097>