

**ENDOPHYTIC BACTERIA OF RARU TREE (*Cotylelobium
melanoxyton* (Hook.f.) Pierre.) PRODUCING SECONDARY
METABOLITES AS ANTIBACTERIALS SOURCES**

Idramsa

Postgraduate Program, Faculty Biology University of Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

The endophytic bacteria of *raru* (*C. melanoxyton*) tree are endosymbion living to form colony within plant tissues without causing disease symptoms. The diversity of endophytic bacteria within plant tissues is a form of interaction whose role and specific function were examined by only few studies in detailed. Some endophytic bacteria are able to control the growth of pathogenic microbes and protect host plants from pest attack. *C. melanoxyton* is a tropical forest tree categorized as an endangered tree and has largely been utilized by local communities as traditional herbal ingredients, so various efforts have been done to conserve. Since the high capacity of endophytic bacteria in producing secondary metabolites, such bacteria are necessary to explore and develop as an agent to produce pathogenic anti-bacteria. The study was effort to reveal the role of endophytic bacteria within *C. melanoxyton* as the host plant. The aims of this study were to obtain endophytic bacteria by an appropriate isolation technique from *C. melanoxyton* stem barks using an appropriate isolation technique; to examine the capability of endophytic bacteria to inhibit the growth of pathogenic bacteria; to analyze their active compounds synthesized using gaseous chromatography and mass spectroscopy (GC-MS); and to identify the endophytic bacteria isolates producing antibacterial compounds based on the sequencing of 16S rRNA gene. The study was initiated by a sterilization of *C. melanoxyton* stem barks using hypochlorite sodium and alcohol solutions; the site of endophytic bacteria colony within sterile stem bark tissues was detected by a histological incision technique, being then stained by a Gram staining method; endophytic bacteria was isolated from sterile stem barks through a serial dilution and a sprayed implant technique in a tryptic soy agar (TSA) medium. Endophytic bacteria producing antibacterial secondary metabolite were selected using a dual culture assay on model bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus subtilis* FNCC 0061, *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063). Endophytic bacteria isolates that show the highest activity to inhibit the pathogenic bacteria were selected for antibacterial production experiment. The capacity of producing antibacterial secondary metabolites of the isolates selected was assayed by a cultivation experiment. Antibacterial activity was determined both qualitatively using a dual culture assay method and quantitatively using a thin-layer chromatography. The content of chemical compounds was detected and analyzed using GC-MS. The selected endophytic bacteria isolates were identified based on polyphasic taxonomy. The results of the study showed that 26 endophytic bacteria isolates

were isolated from *C. melanoxyton* stem barks included gram positive in nature (17 isolates) and gram negative (9 isolates). The endophytic bacteria were located at specific cells within vascular or phellem tissues by forming red and purple cell colony. The selected endophytic bacteria isolates (strain BER-17) demonstrated the highest inhibition activity against the bacterial growth of *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 with clear zone diameter of 10 mm and 12 mm respectively. During the cultivation experiment, the selected endophytic bacteria isolate (strain BER-17) demonstrated its capability to produce antibacterial compounds with specific inhibition activity against gram positive and gram negative bacteria tested, with inhibiting zone diameter of *B. subtilis* (25 mm), *E. coli* (17 mm) dan *S. aureus* (18 mm), respectively. Based on TLC analyses cell culture dichlorometane extract contained compounds categorized as flavonoid with R_f of 0.56 and alkaloid with R_f of 0.72, and GC-MS analyse revealed the active compounds comprised of *Hexadecanoic acid, ethyl ester* and *Ergotamine*, assumed to act as antibacterial activities. The results of phenetic identification and phylogenetic tree analysis, isolates of BER-17 having characters similar to those of genus *Nocardiopsis* sp a similarity index of 97%, and had a kinship close with the species *Nocardiopsis halotolerans* with a similarity index of 94.76%. Conclusion of the research was that barks of *C. melanoxyton* used as medicinal plants harbors a population endophytic bacteria predominated by actinomycetes including some rare genera; the selected endophytic isolate of strain BER-17 identified as *Nocardiopsis* sp., served as a potential source of novel antibiotic, consisting of *hexadecanoic acid ethyl ester* and *ergotamine*. An effective and efficient such antibacterial activity is important to explore endophytic bacteria for novel antibiotics.

Keywords: endophytic bacteria, isolation, *C. melanoxyton*, *Nocardiopsis* sp. of strain BER-17, antibacteria

**BAKTERI ENDOFIT POHON RARU (*Cotylelobium melanoxylo*n (Hook.f.)
Pierre.) SEBAGAI PENGHASIL METABOLIT SEKUNDER
ANTIBAKTERI**

Idramsa

Program Pascasarjana Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

INTISARI

Bakteri endofit pada pohon raru (*C. melanoxylo*n) merupakan endosimbion yang hidup membentuk koloni di dalam jaringan tumbuhan tanpa menimbulkan gejala penyakit. Keanekaragaman bakteri endofit di dalam jaringan tumbuhan yang merupakan bentuk interaksi, belum banyak diteliti dengan rinci tentang peran dan fungsinya. Beberapa bakteri endofit mampu mengendalikan pertumbuhan mikrobial patogen dan melindungi tumbuhan inang dari serangan hama. *C. melanoxylo*n merupakan tumbuhan hutan tropis yang dikategorikan sebagai tumbuhan langka dan telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai ramuan obat tradisional, maka berbagai upaya telah dilakukan untuk kelestariannya. Mengingat peran bakteri endofit yang tinggi dalam menghasilkan metabolit sekunder, bakteri tersebut perlu dieksplorasi dan dikembangkan sebagai agensia penghasil antibakteri patogen. Penelitian ini berusaha mengungkap peran bakteri endofit pada *C. melanoxylo*n sebagai tumbuhan inang. Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan bakteri endofit dari kulit batang *C. melanoxylo*n dan cara mengisolasinya pada jaringan; menguji kemampuan tumbuh isolat bakteri endofit terpilih pada medium cair dan aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri patogen; menganalisis kandungan senyawa aktif yang disintesis oleh isolat bakteri endofit terpilih dari kulit batang *C. melanoxylo*n dan mengidentifikasi isolat bakteri endofit terpilih berdasarkan sekuens gen 16S rRNA. Penelitian diawali dengan sterilisasi sampel kulit batang *C. melanoxylo*n dengan larutan sodium hipoklorit dan alkohol; letak koloni bakteri endofit di dalam jaringan kulit batang steril dideteksi dengan menggunakan teknik sayatan histologi, kemudian diwarnai dengan cat Gram; bakteri endofit diisolasi dari kulit kayu steril melalui pengenceran seri dan teknik pananaman secara taburan pada medium *tryptic soy agar* (TSA). Seleksi bakteri endofit penghasil metabolit sekunder (antibakteri) dilakukan dengan menggunakan metoda kultur ganda (*dual culture assay*) terhadap bakteri model (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus subtilis* FNCC 0061, *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063). Isolat bakteri endofit yang menunjukkan aktivitas penghambatan tertinggi terhadap bakteri patogen dipilih untuk percobaan produksi antibakteri. Kemampuan produksi metabolit sekunder (antibakteri) isolat terpilih dilakukan melalui percobaan kultivasi. Aktivitas antibakteri ditentukan secara kualitatif (metoda kultur ganda) dan kuantitatif dengan kromatografi lapis tipis (KLT), kandungan senyawa kimia dideteksi dan dianalisis secara kromatografi gas-spektrometri massa (KG-SM). Identifikasi isolat bakteriendofit terpilih

diidentifikasi berdasarkan polifasik taksonomi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 26 isolat bakteri endofit telah diisolasi dari kulit batang *C. melanoxyton* dan bersifat gram positif (17.isolat) dan gram negatif (9.isolat). Bakteri endofit tersebut terdapat pada sel spesifik di dalam jaringan vaskular atau jaringan phellem dengan membentuk koloni warna merah dan keunguan. Salah satu isolat bakteri endofit (strain BER-17) mendemonstrasikan aktivitas penghambatan tertinggi terhadap pertumbuhan *Eschericia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan diameter masing-masing 11 mm dan 12 mm. Selama percobaan kultivasi, isolat bakteri endofit BER-17 mampu memproduksi senyawa anti bakteri dengan aktivitas penghambatan yang spesifik terhadap bakteri uji Gram positif dan Gram negatif, masing-masing *B. subtilis* (25 mm), *E. coli* (17 mm) dan *S. aureus* (18 mm). Hasil KLT ekstrak diklorometan isolat bakteri endofit BER-17 digolongkan senyawa flavonoid dengan R_f 0,56 dan alkaloid dengan R_f 0,72, kemudian berdasarkan KG-SM terkandung senyawa *Hexadecanoic acid, ethyl ester* dan *Ergotamine* yang memiliki aktivitas antibakteri. Ekstrak metanolik kulit kayu *C. melanoxyton* mengandung tannin, melanoxyton B, bersama-sama dengan dimer stilbene membentuk (+)-epsilon-viniferin dan cis – (+) – epsilon-viniferin; vaticanol A, E dan G. Senyawa tersebut menimbulkan aktivitas antibakteri. Hasil identifikasi secara fenetik dan analisis pohon filogenetik, isolat BER-17 memperlihatkan karakter yang mirip dengan genus *Nocardiopsis* sp. (peringkat kesamaan 97%), dan memiliki hubungan kekerabatan dekat dengan jenis *Nocardiopsis halotolerans* dengan indeks similaritas 94.76%. Kesimpulan penelitian adalah kulit batang raru (*C. melanoxyton*) sebagai obat tradisional memiliki populasi bakteri endofit yang didominasi oleh actinobacteria termasuk genus yang langka, isolat bakteri endofit *Nocardiopsis* sp. strain BER-17 menghasilkan senyawa antibakteri terdiri dari asam *hexadecanoic acid ethyl ester* dan *ergotamine* yang mempunyai spektrum luas (*broad spectrum*). Efektivitas aktivitas antibakteri tersebut sangat penting memungkinkan bakteri endofit untuk dikembangkan sebagai bahan baku antibiotik baru.

Kata kunci: bakteri endofit, isolasi, *C. melanoxyton*, *Nocardiopsis* sp. strain BER-17, antibakteri.