

**IDENTIFIKASI MOLEKULER BERDASARKAN ANALISIS GEN 16S
rRNA DAN UJI POTENSI ANTIBIOFILM BAKTERI ENDOFIT DARI
SAMPEL BUAH KAKAO (*Theobroma cacao* L.)**

(Skripsi)

Oleh

DIAJENG MAHARANI LATIFAH

NPM 2117021109



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

ABSTRAK

IDENTIFIKASI MOLEKULER BERDASARKAN ANALISIS GEN 16S rRNA DAN UJI POTENSI ANTIBIOFILM BAKTERI ENDOFIT DARI SAMPEL BUAH KAKAO (*Theobroma cacao* L.)

Oleh

DIAJENG MAHARANI LATIFAH

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan tanaman perkebunan yang termasuk dalam famili *Sterculiaceae*. Kakao mempunyai potensi bersimbiosis dengan mikroba endofit, salah satunya yaitu dari kelompok bakteri. Bakteri endofit pada kakao diketahui berperan dalam meningkatkan pertumbuhan kakao dan melindungi tanaman dari penyakit. Pengetahuan tentang bakteri endofit yang menghuni tanaman kakao terkait dengan potensinya sebagai antimikroba atau antibiofilm masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri endofit pada buah kakao secara molekuler berdasarkan analisis gen 16S rRNA dan menguji potensi antibiofilmnya dalam bentuk ekstrak padat. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Taksa Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, pada bulan Februari – Maret 2025. Perlakuan identifikasi bakteri endofit dilakukan dengan metode analisis molekuler meliputi ekstraksi DNA, amplifikasi gen 16S rRNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), elektroforesis, sekuensing DNA, dan analisis filogenetik. Perlakuan uji potensi antibiofilm dilakukan dengan metode *microtiter plate* (MtP) menggunakan ekstrak dari bakteri endofit kakao, meliputi perlakuan uji penghambatan pertumbuhan biofilm dan uji penghancuran biofilm dengan perhitungan persentase hasil dari tiap perlakuan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri endofit buah kakao yang berhasil diidentifikasi berasal dari genus *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Priestia*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, dan *Bacillus*. Pengujian antibiofilm menunjukkan bahwa ekstrak bakteri endofit yang diuji menghasilkan persentase yang negatif dalam menghambat pertumbuhan biofilm, namun pada beberapa konsentrasi (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, dan 1,56%) menghasilkan persentase yang positif dalam mendegradasi biofilm.

Kata Kunci: bakteri endofit, *Theobroma cacao* L, gen 16S rRNA, antibiofilm, identifikasi molekuler

ABSTRACT

MOLECULAR IDENTIFICATION BASED ON 16S rRNA GENE ANALYSIS AND ANTIBIOFILM POTENTIAL TEST OF ENDOPHYTE BACTERIA FROM CACAO FRUIT (*Theobroma cacao* L.) SAMPLES

By

DIAJENG MAHARANI LATIFAH

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a plantation crop belonging to the *Sterculiaceae* family. Cocoa has the potential to form a symbiosis with endophytic microbes, including bacteria. Endophytic bacteria in cocoa are known to play a role in enhancing cocoa growth and protecting plants from disease. Knowledge of endophytic bacteria inhabiting cocoa plants and their potential as antimicrobials or antibiofilms is still limited. This study aimed to molecularly identify endophytic bacteria in cocoa pods based on 16S rRNA gene analysis and to test their antibiofilm potential in solid extract form. This research was conducted at the Taxa Laboratory of the National Research and Innovation Agency (BRIN), Cibinong, from February to March 2025. Identification of endophytic bacteria was carried out using molecular analysis methods including DNA extraction, 16S rRNA gene amplification using *Polymerase Chain Reaction* (PCR), electrophoresis, DNA sequencing, and phylogenetic analysis. Antibiofilm potency testing was conducted using the *microtiter plate* (MtP) method using extracts from cocoa endophytic bacteria. These tests included biofilm growth inhibition and biofilm destruction, with percentage results calculated for each treatment.

The results showed that the identified cocoa fruit endophytic bacterial isolates belonged to the genera *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Priestia*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, and *Bacillus*. Antibiofilm testing revealed that the endophytic bacterial extracts produced negative biofilm growth inhibition rates, but at several concentrations (100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13%, and 1.56%), they produced positive biofilm degradation rates.

Keywords: endophytic bacteria, *Theobroma cacao* L, 16S rRNA gene, antibiofilm, molecular identification

**IDENTIFIKASI MOLEKULER BERDASARKAN ANALISIS GEN 16S
rRNA DAN UJI POTENSI ANTIBIOFILM BAKTERI ENDOFIT DARI
SAMPEL BUAH KAKAO (*Theobroma cacao* L.)**

Oleh

DIAJENG MAHARANI LATIFAH

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

Judul Skripsi

: IDENTIFIKASI MOLEKULER
BERDASARKAN ANALISIS GEN 16S rRNA
DAN UJI POTENSI ANTIBIOFILM
BAKTERI ENDOFIT DARI SAMPEL BUAH
KAKAO (*Theobroma cacao* L.)

Nama Mahasiswa

: **Diajeng Maharani Latifah**

Nomor Pokok Mahasiswa

: 2117021109

Program Studi

: S1 Biologi

Jurusan

: Biologi

Fakultas

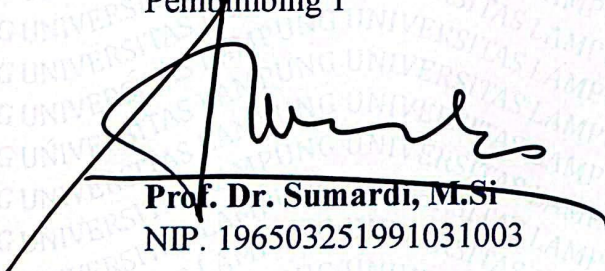
: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

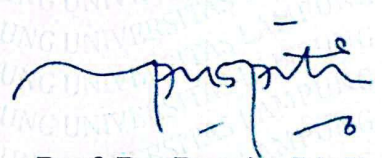
MENYETUJUI,

1. Komisi Pembimbing

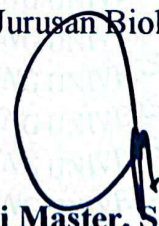
Pembimbing 1

Pembimbing 2


Prof. Dr. Sumardi, M.Si
NIP. 196503251991031003


Prof. Dr. Puspita Lisdiyanti, M.Agr., Chem
NIP. 196708141987012001

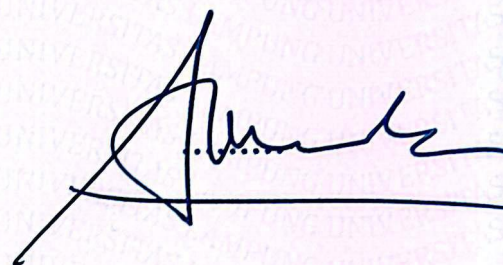
2. Ketua Jurusan Biologi FMIPA


Dr. Jani Master, S.Si., M.Si
NIP. 198301312008121001

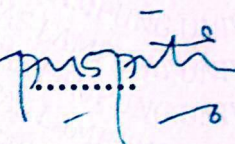
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

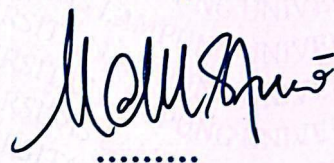
Ketua Penguji : Prof. Dr. Sumardi, M.Si.



Anggota Penguji : Prof. Dr. Puspita Lisdiyanti, M.Agr., Chem.



Penguji Utama : Dr. Mahfut, S.Si., M.Sc.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 30 September 2025

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Diajeng Maharani Latifah
NPM : 2117021109
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul:

“Identifikasi Molekuler Berdasarkan Analisis Gen 16S rRNA dan Uji Potensi Antibiofilm Bakteri Endofit Dari Sampel Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.)”

Apa yang tertulis dalam karya ilmiah baik data, gagasan, dan pembahasannya adalah benar karya saya sendiri berdasarkan pengetahuan dan informasi yang telah saya dapatkan. Karya ilmiah ini saya susun dengan mengikuti aturan dan etika akademik yang berlaku dan tidak berisikan hasil karya orang lain yang telah dipublikasikan sebelumnya.

Demikian surat pernyataan ini saya buat, jika dikemudian hari pernyataan ini tidak benar atau terdapat kecurangan, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 30 September 2025



Diajeng Maharani Latifah

NPM. 2117021109

RIWAYAT HIDUP



Diajeng Maharani Latifah, lahir pada 30 Desember 2002 di Bandar Lampung. Penulis merupakan anak bungsu dari pasangan Alm. Bapak Warsono bin Alm. Ahmad Busaeri dan Ibu Haryani binti Alm. Ashari. Penulis menempuh pendidikan pertama di SD Tunas Bangsa pada tahun 2009 – 2015. Penulis melanjutkan pendidikan di SMP Negeri 1 Dente Teladas pada tahun 2015 – 2018.

Penulis memutuskan untuk lanjut ke MAN 1 Lampung Timur pada tahun 2018 – 2021. Penulis resmi diterima sebagai mahasiswa di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung pada tahun 2021 melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjalani pendidikan di perguruan tinggi, penulis aktif dalam kegiatan akademik dan praktikum. Penulis menjadi anggota di Bidang Ekspedisi pada Organisasi Himpunan Mahasiswa Biologi (Himbio) periode 2022. Penulis mengikuti program Merdeka Belajar Kampus Merdeka (MBKM) sekaligus melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) pada bulan Agustus 2023 hingga bulan Februari 2024 di Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Cibinong, Bogor. Penulis menyusun laporan MBKM dan PKL dengan judul **“Isolasi Bakteri Endofit Dari Sampel Biji dan Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.)”**. Penulis juga melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Negeri Agung 1, Kecamatan Gunung Pelindung, Kabupaten Lampung Timur pada bulan Juni – Agustus 2024.

PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim

Segala puja dan puji syukur bagi Allah SWT atas limpahan rahmat, nikmat, dan karunia yang diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.

Shalawat dan salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Baginda Nabi Muhammad SAW, yang syafaatnya kita harapkan kelak di hari akhir. Segenap rasa cinta dan hormat saya persembahkan karya ini kepada:

Ibu tersayang yang tidak pernah lelah mendoakan, mendukung, dan menjadi penyemangat dalam setiap langkah dalam perjuangan ini, serta untuk Alm. Ayah tercinta. Kepada kakak laki-laki penulis, terimakasih atas semangat dan dukungan yang diberikan.

Bapak dan Ibu pembimbing yang senantiasa membimbing, memberikan arahan, dan memberikan segenap ilmu pengetahuan yang sangat bermanfaat selama proses penelitian dan penyusunan tugas akhir ini.

Almamater tercinta, Universitas Lampung.

MOTTO

“...Boleh jadi kamu tidak menyenangi sesuatu, padahal itu baik bagimu, dan boleh jadi kamu menyukai sesuatu, padahal itu tidak baik bagimu. Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui.”

(Q.S. Al-Baqarah: 216)

“...Ingatlah, sesungguhnya pertolongan Allah itu dekat.”

(Q.S Al-Baqarah: 214)

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya.”

(Q. S. Al-Baqarah: 286)

“Bisa jadi ujian dan cobaan yang tidak engkau sukai, akan membawamu menuju anugerah indah yang tak pernah kau bayangkan sebelumnya.”

(Syekh Mutawalli Assya'rawi)

“You only live once, but if you do it right, once is enough.”

(Mae West)

“It is our choices, that show what we truly are, far more than our abilities.”

(J.K. Rowling)

SANWACANA

Bismillahirrahmanirrahim...

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Alhamdulillahirrabil'alamin.

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul **“Identifikasi Molekuler Berdasarkan Analisis Gen 16S rRNA dan Uji Potensi Antibiofilm Bakteri Endofit Dari Sampel Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.)”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Program Studi S1 Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penyusunan skripsi ini tentunya tidak luput dari bantuan, dukungan, serta bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati, penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu tercinta, Ibu Haryani yang selalu mendoakan, memberikan dukungan, perhatian dan semangat. Terimakasih atas kasih sayang yang telah diberikan hingga kini. Ayah tercinta yang do'a nya di semasa hidupnya selalu menyertai di dalam hidup Penulis.
2. Kakak tersayang, Muhammad Yusuf Bachtiar, terimakasih untuk selalu mendoakan dan memberikan dukungan semangat.
3. Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A, IPM., ASEAN Eng., selaku Rektor Universitas Lampung.

4. Bapak Dr. Jani Master, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik dan Ketua Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
5. Ibu Dr. Kusuma Handayani, M.Si., selaku Ketua Program Studi S1 Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
6. Bapak Prof. Dr. Sumardi, M.Si., selaku Dosen Pembimbing I yang telah membimbing, memberikan ilmu pengetahuan, saran, masukan, serta solusi hingga pada tahap penyelesaian skripsi.
7. Ibu Prof. Dr. Puspita Lisdiyanti, M.Agr., Chem., selaku Dosen Pembimbing II yang telah membimbing, memberikan saran, masukan, serta solusi baik dalam hal penelitian maupun penulisan skripsi. Serta selaku Pembimbing Teknis yang telah membimbing Penulis selama melakukan penelitian, memberikan ilmu pengetahuan, pembelajaran, serta memberikan kesempatan dan kepercayaan kepada Penulis untuk membantu penelitian.
8. Bapak Dr. Mahfut, S.Si., M.Sc., selaku Dosen Pembahas yang telah membimbing, memberikan saran, dan masukan dalam penyempurnaan skripsi.
9. Seluruh Bapak dan Ibu dosen Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung atas ilmu pengetahuan yang diberikan selama aktivitas perkuliahan hingga mencapai gelar sarjana.
10. Seluruh staff dan karyawan Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung atas segala dukungannya kepada Penulis selama aktivitas perkuliahan hingga mencapai gelar sarjana.
11. Seluruh staff dan karyawan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung atas segala dukungannya kepada Penulis selama aktivitas perkuliahan hingga mencapai gelar sarjana.
12. Seluruh pegawai di Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Cibinong yang telah membantu dan memberikan ilmu pengetahuannya, serta sarana kepada Penulis selama penelitian berlangsung.
13. Kepada Andrew M. B. Diaz yang dengan ketulusan hati selalu siap membantu dan menemani Penulis selama proses penyusunan skripsi hingga selesai.

14. Kakak-kakak *research assistant*, Kak Farel, dan Kak Alfi yang senantiasa dengan sabar membantu, mengajarkan, dan memberikan ilmunya kepada Penulis.
15. Kakak dan teman-teman seperjuangan yang magang atau penelitian di BRIN Cibinong, terimakasih atas ilmu dan momen-momen yang diberikan. Terimakasih atas kehadirannya yang hangat dalam rangka menjalankan penelitian bersama-sama di BRIN Cibinong.
16. Sobat Hijrah, Vanya, Nabilah, Faska, Cintya, Episcia, Intan, Olsie, Fakhri, dan Hafidz, yang telah hadir menemani kehidupan perkuliahan Penulis dalam suka maupun duka, dan senantiasa membantu Penulis.
17. Semua teman Jurusan Biologi FMIPA Unila angkatan 2021, terimakasih atas kehadirannya selama masa perkuliahan berlangsung.

Bandar Lampung, 30 September 2025
Penulis,

Diajeng Maharani Latifah

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Manfaat Penelitian.....	4
1.4 Kerangka Pemikiran	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	7
2.1.1 Klasifikasi Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	7
2.1.2 Morfologi Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	7
2.1.3 Pemanfaatan dan Nilai Potensi Kakao.....	9
2.2 Bakteri Endofit.....	9
2.3 Gen 16S rRNA.....	10
2.4 Biofilm.....	12
2.4.1 Definisi Biofilm	12
2.4.2 Resistensi Biofilm Terhadap Antibiotik	12
2.4.3 Uji Pembentukan Biofilm	13
2.4.3.1 Metode Tabung.....	13
2.4.3.2 Metode <i>Congo Red Agar</i>	13
2.4.3.3 Metode <i>Microtiter Plate</i> (MtP)	14
2.4.3.4 Metode PCR.....	14
III. METODE PENELITIAN.....	15
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	15
3.2 Alat dan Bahan	15
3.2.1 Alat	15
3.2.2 Bahan	15
3.3 Prosedur Penelitian.....	16
3.3.1 Isolasi dan Pemurnian Bakteri Endofit.....	16
3.3.2 Ekstraksi DNA.....	16
3.3.3 Amplifikasi Gen 16S rRNA.....	17
3.3.4 Elektroforesis Produk PCR	18

3.3.5	Sekuensing Gen 16S rRNA	18
3.3.6	Analisis Filogenetik	19
3.3.7	Kultur Mikroorganisme	19
3.3.8	Produksi Ekstrak Bakteri Endofit	20
3.3.9	Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm	20
3.3.10	Uji Penghancuran Biofilm	22
3.4	Diagram Alir Penelitian	24
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
4.1	Hasil Penelitian	25
4.1.1	Hasil Sekuensing Gen 16S rRNA	25
4.1.2	Konstruksi Pohon Filogenetik Berdasarkan Gen 16S rRNA	34
4.1.3	Hasil Produksi Ekstrak Bakteri Endofit Kakao	45
4.1.4	Hasil Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>E. coli</i>	46
4.1.5	Hasil Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>S. aureus</i>	52
4.1.6	Hasil Uji Penghancuran Biofilm dari Bakteri Uji <i>E. coli</i>	58
4.1.7	Hasil Uji Penghancuran Biofilm dari Bakteri Uji <i>S. aureus</i>	64
4.2	Pembahasan	72
4.2.1	Hubungan Filogenetik Isolat K-01	72
4.2.2	Hubungan Filogenetik Isolat K-02, K-11, K-13, K-16, dan K-17	73
4.2.3	Hubungan Filogenetik Isolat K-03	75
4.2.4	Hubungan Filogenetik Isolat K-08	76
4.2.5	Hubungan Filogenetik Isolat K-10	77
4.2.6	Hubungan Filogenetik Isolat K-19	78
4.2.7	Hubungan Filogenetik Isolat K-25 dan K-29	79
4.2.8	Kehadiran Genus <i>Enterobacter</i> , <i>Cronobacter</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Klebsiella</i> , dan <i>Bacillus</i> pada Buah Kakao	80
4.2.9	Ketiadaan Potensi Ekstrak Bakteri Endofit Terhadap Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>E. coli</i> Berdasarkan Hasil Nilai OD	81
4.2.10	Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>E. coli</i> oleh Ekstrak Bakteri Endofit	82
4.2.11	Ketiadaan Potensi Ekstrak Bakteri Endofit Terhadap Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>S. aureus</i> Berdasarkan Hasil Nilai OD	84
4.2.12	Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>S. aureus</i> oleh Ekstrak Bakteri Endofit	85
4.2.13	Potensi Ekstrak K-03 dan K-11 Bakteri Endofit Terhadap Penghancuran Biofilm <i>E. coli</i> Berdasarkan Hasil Nilai OD	87
4.2.14	Ketiadaan Potensi Ekstrak K-19 Bakteri Endofit Terhadap Penghancuran Biofilm <i>E. coli</i> Berdasarkan Hasil Nilai OD	88
4.2.15	Aktivitas Penghancuran Biofilm <i>E. coli</i> oleh Ekstrak K-03 dan K-11 Bakteri Endofit	89
4.2.16	Aktivitas Penghancuran Biofilm <i>E. coli</i> oleh Ekstrak K-19 Bakteri Endofit	91

4.2.17	Potensi Ekstrak Bakteri Endofit Terhadap Penghancuran Biofilm <i>S. aureus</i> Berdasarkan Nilai OD	92
4.2.18	Aktivitas Penghancuran Biofilm <i>S. aureus</i> oleh Ekstrak Bakteri Endofit	93
V.	SIMPULAN DAN SARAN	95
5.1	Simpulan.....	95
5.2	Saran	96
	DAFTAR PUSTAKA	97
	LAMPIRAN.....	104

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi bahan amplifikasi gen 16S rRNA	17
2. Hasil sekuensing gen 16S rRNA.....	25
3. Sekuens hasil analisis BLAST	33
4. Hasil ekstrak bakteri endofit	45
5. Hasil persentase penghambatan pertumbuhan biofilm <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-03	105
6. Hasil persentase penghambatan pertumbuhan biofilm <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-11	106
7. Hasil persentase penghambatan pertumbuhan biofilm <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-19	107
8. Hasil persentase penghambatan pertumbuhan biofilm <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-03	108
9. Hasil persentase penghambatan pertumbuhan biofilm <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-11	109
10. Hasil persentase penghambatan pertumbuhan biofilm <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-19	110
11. Hasil persentase penghancuran biofilm <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-03	111
12. Hasil persentase penghancuran biofilm <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-11	112
13. Hasil persentase penghancuran biofilm <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-19	113
14. Hasil persentase penghancuran biofilm <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-03	114
15. Hasil persentase penghancuran biofilm <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-11	115
16. Hasil persentase penghancuran biofilm <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-19	116

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Buah kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	8
2. Diagram alir tahapan penelitian	24
3. Diagram pohon filogenetik isolat K-01	35
4. Diagram pohon filogenetik isolat K-02, K-11, K-13, K-16, dan K-17.....	37
5. Diagram pohon filogenetik isolat K-03	39
6. Diagram pohon filogenetik isolat K-08	40
7. Diagram pohon filogenetik isolat K-10	41
8. Diagram pohon filogenetik isolat K-19	42
9. Diagram pohon filogenetik isolat K-25 dan K-29.....	44
10. Hasil Optical Density (OD) uji penghambatan pertumbuhan biofilm bakteri uji <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-03.....	47
11. Persentase aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm bakteri uji <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-03	48
12. Hasil Optical Density (OD) uji penghambatan pertumbuhan biofilm bakteri uji <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-11	49
13. Persentase aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm bakteri uji <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-11	50
14. Hasil Optical Density (OD) uji penghambatan pertumbuhan biofilm bakteri uji <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-19.....	51
15. Persentase aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm bakteri uji <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-19	52
16. Hasil Optical Density (OD) uji penghambatan pertumbuhan biofilm bakteri uji <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-03	53
17. Persentase aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm bakteri uji <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-03	54

18. Hasil Optical Density (OD) uji penghambatan pertumbuhan biofilm bakteri uji <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-11	55
19. Persentase aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm bakteri uji <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-11	56
20. Hasil Optical Density (OD) uji penghambatan pertumbuhan biofilm bakteri uji <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-19	57
21. Persentase aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm bakteri uji <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-19	58
22. Hasil Optical Density (OD) uji penghancuran biofilm bakteri uji <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-03	59
23. Persentase aktivitas penghancuran biofilm pada uji penghancuran biofilm bakteri uji <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-03	60
24. Hasil Optical Density (OD) uji penghancuran biofilm bakteri uji <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-11	61
25. Persentase aktivitas penghancuran biofilm pada uji penghancuran biofilm bakteri uji <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-11	62
26. Hasil Optical Density (OD) uji penghancuran biofilm bakteri uji <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-19	63
27. Persentase aktivitas penghancuran biofilm pada uji penghancuran biofilm bakteri uji <i>E. coli</i> oleh ekstrak K-19	64
28. Hasil Optical Density (OD) uji penghancuran biofilm bakteri uji <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-03	65
29. Persentase aktivitas penghancuran biofilm pada uji penghancuran biofilm bakteri uji <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-03	66
30. Hasil Optical Density (OD) uji penghancuran biofilm bakteri uji <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-11	67
31. Persentase aktivitas penghancuran biofilm pada uji penghancuran biofilm bakteri uji <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-11	68
32. Hasil Optical Density (OD) uji penghancuran biofilm bakteri uji <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-19	70
33. Persentase aktivitas penghancuran biofilm pada uji penghancuran biofilm bakteri uji <i>S. aureus</i> oleh ekstrak K-19	71
34. Proses ekstraksi DNA	117
35. Running PCR	117
36. Pembuatan gel agarosa	117
37. Proses elektroforesis	117

38. Visualisasi pita DNA	117
39. Pembuatan media	117
40. Kultur bakteri uji	118
41. Inkubasi kultur cair bakteri uji	118
42. Inkubasi kultur cair bakteri endofit	118
43. Pembuatan suspensi bakteri uji	118
44. Penambahan etil asetat pada kultur cair bakteri endofit	118
45. Proses pemisahan ekstrak etil asetat dengan corong pisah	118
46. Penguapan etil asetat	119
47. Uji penghambatan biofilm	119
48. Uji penghancuran biofilm	119

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao merupakan tanaman perkebunan dengan nama ilmiah *Theobroma cacao* L. dan termasuk dalam famili *Sterculiaceae*. Tanaman ini berasal dari Amerika Selatan yang saat ini banyak ditanam di berbagai kawasan tropis, termasuk Indonesia. Masyarakat menanam pohon kakao terutama untuk diambil buahnya. Bagian dari buah yang digunakan adalah kulit buah, pulp/daging buah dan biji kakao (Farhanandi dan Indah, 2022).

Kulit buah kakao diketahui memiliki kandungan metabolit sekunder berupa flavonoid. Flavonoid dapat digunakan sebagai antimikroba dan antivirus. Alkaloid juga merupakan salah satu metabolit sekunder yang terkandung dalam kulit buah kakao. Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antimikroba dan antiparasit sehingga berperan dalam perlindungan tanaman sebagai agen kontrol. Selain itu, metabolit sekunder tanin dan saponin juga terdapat pada kulit buah kakao. Metabolit sekunder tanin dan saponin memiliki kemampuan sebagai antimikroba (Adha dan Ibrahim, 2021). Biji kakao merupakan bagian dari tanaman herbal yang berpotensi sebagai *neutraceutical* (Attahmid dkk., 2021).

Terkait dengan produksi metabolit sekunder, bakteri endofit memiliki kemampuan untuk memproduksi senyawa bioaktif dengan sifat antimikroba ataupun antibiofilm yang serupa dengan yang dihasilkan oleh tanaman inangnya. Hal ini membuka peluang untuk memanfaatkan bakteri endofit sebagai agen hayati dalam pengendalian mikroorganisme patogen,

karena kemampuannya dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang memiliki sifat antagonis terhadap patogen. Bakteri endofit mampu memproduksi senyawa bioaktif dengan sifat antimikroba yang serupa dengan tanaman tempatnya hidup (Lubis dkk., 2024).

Bakteri endofit dapat diisolasi dari berbagai jenis tumbuhan mulai dari monokotil hingga dikotil. Isolasi bakteri endofit telah dilakukan lebih dari 20 tahun yang lalu dan setiap bagian tanaman ditemukan adanya mikroba endofit, baik pada daun, akar maupun batang. Saat ini terdapat sekitar 300.000 spesies tanaman di dunia yang menjadi inang dari satu atau lebih bakteri endofit (Ginting dkk., 2020). Kakao (*Theobroma cacao* L.) mempunyai potensi bersimbiosis dengan mikroba endofit. Mikroba endofit bersifat kompetisi langsung dengan patogen di dalam jaringan tanaman dan dapat bersifat mikroparasit secara langsung pada kakao (Noviani dkk., 2019). Berbagai penelitian tentang komunitas bakteri yang berasosiasi dengan tanaman sebagai endofit telah berkembang cukup pesat. Komunitas endofit memberikan keuntungan terhadap tanaman inangnya seperti melindungi tanaman melawan herbivora, serangga, atau patogen, serta mampu menstimulasi pertumbuhan tanaman (Ginting dkk., 2020). Penelitian oleh Sijabat dkk. (2021), menyatakan efektivitas bakteri endofit untuk mengendalikan penyakit busuk buah pada kakao yang disebabkan jamur *Phytophthora palmivora* memberikan efek yang positif dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen. Selain itu, penelitian oleh Khaeruni dkk. (2020), menyatakan isolat bakteri endofit asal tanaman kakao berpotensi sebagai pemacu pertumbuhan tanaman karena unggul dalam memperbaiki mutu fisiologis benih dan meningkatkan pertumbuhan tanaman kakao di persemaian. Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri endofit dapat menjadi agen hayati yang ramah lingkungan.

Informasi mengenai bakteri dan potensinya dapat diketahui dengan cara melakukan identifikasi bakteri. Identifikasi bakteri salah satunya dapat dilakukan melalui identifikasi molekuler, yang merupakan suatu cara mengidentifikasi bakteri menggunakan materi genetik yang dimiliki bakteri. Identifikasi molekuler bakteri dianggap lebih akurat jika dibandingkan dengan identifikasi menggunakan uji biokimia, karena tidak dipengaruhi oleh faktor internal seperti tahap pertumbuhan maupun faktor eksternal seperti lingkungan tempat tumbuhnya. Salah satu cara identifikasi bakteri secara molekuler yaitu melalui analisis gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA ada pada setiap bakteri dan memiliki variasi yang cukup untuk membedakan spesies bakteri dan bersifat lestari. (Chrisnawati dkk., 2023). Metode berbasis molekuler ini dinilai cepat dan akurat dalam mengidentifikasi bakteri. Dari segi waktu, analisis sekuensing memiliki keunggulan karena dapat dilakukan dalam waktu singkat (Nontji dkk., 2022).

Biofilm adalah sekelompok mikroorganisme dimana sel-selnya saling terikat satu sama lain dan dapat melakukan komunikasi antar sel melalui matriks polisakarida. Struktur alami biofilm dapat melindungi sel-selnya terhadap agen antimikroba dan mampu mempertahankan sel host-nya, sehingga menyebabkan resistensi terhadap antibiotik yang diberikan (Uthari dkk., 2017). Terbentuknya biofilm tidak hanya pada tubuh manusia, tetapi juga terjadi pada tanaman, hewan, dan juga lingkungan (Sentenac dkk., 2022). Di masa sekarang, mikroorganisme patogen ataupun biofilm patogen dianggap menjadi mediator utama infeksi, dan sekitar 80% peristiwa infeksi dikaitkan melalui pembentukan biofilm (Herman dkk., 2024; de Novais dkk., 2023).

Penelitian terdahulu mengenai bakteri endofit sebagai antibiofilm (antara lain Priyanto dkk., 2023) meneliti tentang aktivitas antibakteri dan antibiofilm bakteri endofit yang berasosiasi dengan *Archidendron pauciflorum* terhadap strain yang resistan terhadap banyak obat, (Kaari *et al.*, 2022) tentang aktivitas antibiofilm dan potensi biokontrol kultur *Streptomyces* terhadap *Ralstonia solanacearum* pada tanaman tomat, (Singh *et al.*, 2024) tentang isolasi target

senyawa antibiofilm dari endofit halofit *Bacillus velezensis* 7NPB-3B yang diisolasi dari tanaman halofit *Salicornia brachiata*. Dari laporan tersebut belum ada dilaporkan mengenai potensi bakteri endofit yang berasosiasi dengan buah kakao (*Theobroma cacao* L.) terkait perannya sebagai antibiofilm, khususnya di Indonesia.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengidentifikasi isolat bakteri endofit yang diperoleh dari buah kakao (*Theobroma cacao* L.) secara molekuler berdasarkan analisis gen 16S rRNA.
2. Menguji potensi antibiofilm dari ekstrak bakteri endofit buah kakao.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai keanekaragaman bakteri endofit pada buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dan menyediakan data dasar untuk pengembangan antibiotik berbasis bakteri endofit serta memberikan alternatif pengendalian biofilm mikroorganisme patogen secara alami.

1.4 Kerangka Pemikiran

Buah kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan tanaman perkebunan yang banyak dibudidaya oleh masyarakat di Indonesia dan mengandung senyawa aktif yang memiliki kemampuan sebagai antimikroba. Di dalam buah kakao diketahui pula terdapat berbagai mikroorganisme endofit, salah satunya yaitu dari kelompok bakteri. Bakteri endofit merupakan mikroorganisme yang hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menyebabkan penyakit bagi inangnya dan mampu memproduksi senyawa metabolit sekunder yang serupa seperti yang dihasilkan oleh tanaman inangnya. Sehingga keberadaan bakteri endofit dalam berbagai tanaman memiliki potensi besar untuk menghasilkan senyawa bioaktif yang bermanfaat, termasuk senyawa antibakteri, antifungi, dan penghambat biofilm.

Pertumbuhan biofilm pada berbagai permukaan, baik biotik maupun abiotik dapat menyebabkan penyakit infeksi terhadap manusia. Adanya matriks EPS yang diproduksi oleh bakteri di dalam biofilm menimbulkan resistensi antibiotik sehingga antibiotik sulit untuk masuk ke dalam biofilm. Diperlukan adanya pengembangan senyawa antibiotik dari produk alami seperti bakteri endofit yang ada di dalam tanaman untuk mengatasi pertumbuhan biofilm.

Belum diketahui bakteri apa saja yang terkandung di dalam buah kakao dan bagaimana potensinya dalam mengatasi biofilm. Diperlukan adanya penelitian untuk mengetahui bakteri endofit yang terkandung di dalam buah kakao dan potensinya dalam menghancurkan biofilm dengan melakukan analisis molekuler terhadap bakteri yang ditemukan di buah kakao dan menguji bakteri yang telah diidentifikasi terhadap biofilm.

Analisis molekuler dilakukan dengan beberapa tahap meliputi isolasi dan pemurnian bakteri untuk mendapatkan koloni murni, ekstraksi DNA untuk mendapatkan DNA murni, amplifikasi gen 16S rRNA, elektroforesis, sekuensing, dan analisis filogenetik.

Pengujian potensi bakteri endofit pada kakao dilakukan dengan beberapa tahapan meliputi produksi ekstrak dari bakteri yang digunakan untuk menghambat dan menghancurkan biofilm, uji penghambatan pertumbuhan biofilm dan uji penghancuran biofilm.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kakao (*Theobroma cacao* L.)

2.1.1 Klasifikasi Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Klasifikasi kakao menurut (Minifie, 1999) adalah sebagai berikut:

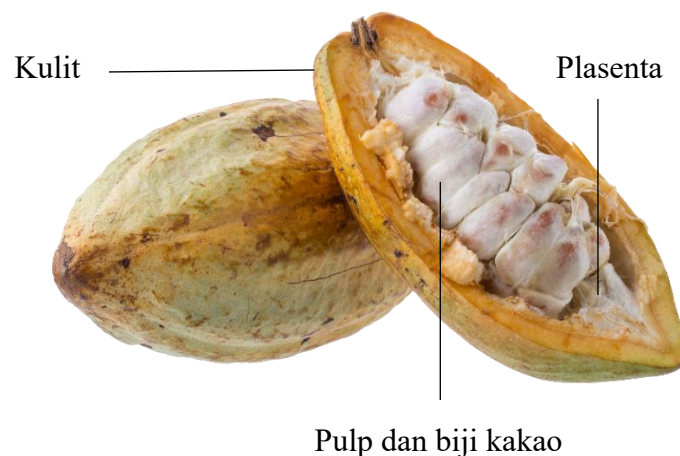
Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Class : Magnoliopsida
Ordo : Malvales
Famili : *Sterculiaceae*
Genus : *Theobroma*
Species : *Theobroma cacao* L. (Minifie 1999)

2.1.2 Morfologi Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) termasuk dalam famili *Sterculiaceae* yang merupakan tanaman asli Amerika Utara, namun sekarang tanaman kakao telah dibudidayakan di daerah tropis. Tinggi tanaman kakao berkisar antara 4-8 m (Riono, 2020). Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) termasuk tanaman tahunan yang tergolong dalam kelompok tanaman caulofloris, yaitu tanaman yang berbunga dan berbuah pada batang dan cabang. Habitat asli tanaman kakao adalah hutan tropis dengan naungan pohon-pohon yang tinggi, curah hujan tinggi, suhu sepanjang tahun relatif sama, serta kelembaban

tinggi yang relatif tetap. Bagian terbesar dari buah kakao terdiri dari kulit luar (mesokarp) yang keras yang mencapai 75%, plasenta berwarna putih dan biji yang berwarna coklat (Sukatik dkk., 2020).

Buah kakao berbentuk lonjong dengan panjang 15-30 cm dan lebar 8-10 cm, buah yang matang berwarna kuning-oranye dengan berat sekitar 500 g ketika matang. Polong buah kakao mengandung 20-60 biji terletak dalam pulp yang berwarna putih. Setiap butir biji kakao mengandung lemak sekitar 40-50 %. Biji kakao mengandung komponen aktif yaitu theobromin, yang merupakan suatu komponen senyawa yang mirip dengan kafein. Karakteristik tanaman kakao diantaranya meliputi batang, cabang, daun, bunga, buah, biji, dan akar. Warna batang coklat tua kehitaman, alur pada kulit batang utama teratur dan rapi, sedangkan alur pada cabang kurang tegas. Permukaan batang utama kasar, alurnya berwarna agak keputihan. Bentuk daun ujungnya runcing, ada penyempitan pada pangkalnya (*bottle neck*) warna daun hijau tua tegas, sedangkan daun muda merah. Bentuk helai daun bulat memanjang (*oblongus*) ujung daun meruncing (*acuminatus*) dan pangkal daun runcing (*acutus*) (Riono, 2020).



Gambar 1. Buah kakao (*Theobroma cacao* L.)
(Sumber: Yuliani dan Fauzana, 2020)

2.1.3 Pemanfaatan dan Nilai Potensi Kakao

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditas unggulan sub sektor perkebunan Indonesia yang memiliki potensi besar, dengan luas areal perkebunan dan produksinya cenderung terus meningkat setiap tahun. Kakao sendiri juga memiliki nilai ekonomis yang tinggi karna memiliki manfaat yang baik terutama dalam industri makanan, minuman bahkan kosmetik (Kadju dkk., 2022). Tumbuhan kakao mengandung senyawa tannin serta kulit buah kakao diketahui mengandung senyawa aktif alkaloid yaitu theobromin (3,7-*dimethylxantine*). Tannin yang terdapat dalam kulit buah kakao mengandung gugus aktif yang dapat berfungsi sebagai inhibitor korosi, antimikroba, dan antioksidan. Senyawa aktif tersebut diketahui memiliki sifat antibakteri. Keberadaan senyawa tersebut di dalam kulit buah kakao diduga menjadi salah satu penyebab tidak ditemukannya penyakit tanaman kakao yang disebabkan oleh bakteri (Sukatik dkk., 2020).

2.2 Bakteri Endofit

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup di dalam jaringan tumbuhan secara simbiotik dengan membentuk koloni selama periode tertentu dari siklus hidupnya dan dapat menghasilkan metabolit sekunder. Kemampuan bakteri endofit untuk melakukan penetrasi ke jaringan internal tanaman dapat disebabkan oleh adanya enzim ekstraseluler berupa selulase yang dihasilkan oleh bakteri tersebut (Sijabat dkk., 2021). Bakteri endofit hidup bersimbiosis saling menguntungkan dengan tanaman dimana bakteri endofit memanfaatkan nutrisi dari hasil metabolisme tanaman untuk hidup (Hamtni dkk., 2022). Sifat bakterial endofit yang belum berpengaruh negatif terhadap jaringan tumbuhan memungkinkan adanya keterkaitan simbiosis mutualisme terhadap bakterial endofit serta inangnya (Sari dkk., 2017). Pada perihal tersebut bakterial endofit memperoleh nutrisi melalui hasil metabolisme tumbuhan

dengan memperoteksikan tumbuhan ketika menghambat patogenik, namun tumbuhan memperoleh derivate nutrisi dengan zat aktif yang dibutuhkan hingga kehidupannya (Pakaya dkk., 2022). Beberapa jenis bakteri endofit dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang bermanfaat dalam melindungi tanaman dari hama dan penyakit (Sari dkk., 2017).

Bakteri endofit masuk ke dalam jaringan tanaman umumnya melalui akar, namun bagian tanaman yang terpapar udara langsung seperti bunga, batang dan kotiledon, juga dapat menjadi jalur masuk bakteri endofit. Saat ini diketahui pula bahwa hubungan antara mikroba endofit dengan tanaman inangnya adalah karena senyawa kimia yang dihasilkan oleh mikroba yang memiliki peran sebagai jenis senyawa bioaktif. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan suatu tanaman baik dari batang, daun, buah, maupun akar yang menghasilkan senyawa antibakteri akan mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain dalam hal ini yakni bakteri patogen penyebab penyakit (Pakaya dkk., 2022).

2.3 Gen 16S rRNA

Gen 16S rRNA adalah gen yang paling lestari pada bakteri. Gen yang paling lestari ini maksudnya adalah gen yang mudah dicari kemiripannya dengan gen yang lain dari spesies bakteri berbeda. *Ribosomalribonucleic Acid* (rRNA) adalah salah satu molekul yang bergabung dengan molekul lain RNA membentuk ribosom yang digunakan pada sintesis protein (Dewata dkk., 2016). Gen ini juga memiliki *hypervariable region* yang merupakan ciri khas tiap mikroorganisme (Nontji dkk., 2022).

Gen pengkode rRNA digunakan untuk menentukan taksonomi, filogeni (hubungan evolusi) serta memperkirakan jarak keragaman antar spesies (*rates of species divergence*) bakteri. Panjang urutan gen 16S rRNA adalah sekitar 1.500 bp dan terdiri dari daerah yang dilestarikan (*conserved regions*). Primer universal biasanya digunakan sebagai pelengkap ke daerah yang dilestarikan

pada bagian awal gen dan di kedua wilayah 540-bp atau pada akhir urutan (sekitar wilayah 1.550 bp), dan urutan pada daerah variabel diantaranya digunakan untuk taksonomi perbandingan. Gen 16S rRNA bersifat universal untuk bakteri, sehingga hubungan filogeni dapat diukur antar semua spesies bakteri. Secara umum, perbandingan urutan gen 16S rRNA memungkinkan diferensiasi antar organisme di tingkat genus pada semua filum utama bakteri dengan tujuan mengklasifikasikan galur di berbagai tingkat, termasuk dalam tingkat spesies. Gen 16S rRNA cenderung memiliki sekuen yang sama pada berbagai jenis bakteri sehingga informasi filogenetik yang diperoleh dapat diterapkan pada banyak jenis bakteri.

Gen 16S rRNA juga memiliki variasi yang cukup besar pada tingkat yang sesuai dengan tingkat perbedaan antara spesies bakteri yang memungkinkan untuk membedakan antara spesies yang sangat mirip secara morfologi atau fisiologi. Secara fungsi, gen 16S rRNA berfungsi untuk menyandi RNA ribosom, yang digunakan untuk sintesis protein, yang mana fungsi ini sangat penting untuk seluruh jenis organisme, sehingga gen ini jarang hilang atau dimodifikasi secara drastis selama evolusi. Database sekuens gen 16S rRNA banyak tersedia di basis data seperti GenBank yang memungkinkan untuk membandingkan sekuen gen 16S rRNA yang diperoleh dengan sekuen di database (Wullur, 2023). Dalam metode ini, fragmen gen 16S rRNA diekspresikan dari isolat bakteri dan kemudian direplikasi secara eksponensial menggunakan reaksi PCR (*Polymerase Chain Reaction*). PCR adalah teknik biologi molekuler yang memungkinkan perbanyakan fragmen DNA secara *in vitro* dengan menggunakan enzim DNA *polymerase* yang bersifat termotabil (Widodo, 2025). Hasil PCR kemudian diamati dan dibandingkan dengan basis data genetik untuk mengidentifikasi bakteri dengan akurasi tinggi. Keuntungan dari metode PCR yaitu prosesnya yang cepat namun memiliki keakuratan yang tinggi (Chrisnawati dkk., 2023).

2.4 Biofilm

2.4.1 Definisi Biofilm

Biofilm merupakan agregat mikroorganisme (bakteri, jamur, alga, atau protozoa) yang tertutup dalam matriks polimer ekstraseluler yang diproduksi oleh mikroorganisme tersebut. Bakteri dalam biofilm dapat terlindung dari berbagai gangguan seperti pengeringan, bakteriofag, amoeba, dan biosida yang digunakan dalam industri (Vogeleer *et al.*, 2014). Secara umum biofilm terdiri atas matriks *extracellular polymeric substances* (EPS), protein, dan atau DNA ekstraseluler (Masrukhin dkk., 2021). Selain itu sel di dalam biofilm cenderung lebih resisten terhadap antibiotik dibanding sel dalam bentuk planktonik. Biofilm juga dapat terbentuk pada alat-alat medis seperti kateter urin. Maka dari itu biofilm menjadi salah satu masalah besar pada kesehatan (Subashchandrabose *et al.*, 2015). Biofilm pada umumnya juga digunakan sebagai strategi bertahan pada suatu kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan seperti fluktuasi suhu maupun nutrisi (Masrukhin dkk., 2021).

2.4.2 Resistensi Biofilm Terhadap Antibiotik

Bakteri di dalam biofilm cenderung resisten terhadap antibiotik dibandingkan bakteri dalam bentuk planktonik. Resistensi ini diperantarai oleh adanya matriks *extracellular polymeric substances* (EPS) yang menyebabkan penetrasi antibiotik ke dalam biofilm menjadi lebih sulit. Beberapa bakteri dapat melakukan mutasi genetik secara acak pada plasmid. Plasmid tersebut dapat dipindahkan ke sel bakteri lain dengan mudah melalui transfer gen horizontal. Pada biofilm, frekuensi transfer gen horizontal terjadi lebih tinggi dibanding pada sel planktonik. Keterbatasan oksigen dan nutrisi di dalam biofilm, terutama pada lapisan terdalam dapat menyebabkan

laju metabolisme, pertumbuhan, dan pembelahan sel lebih lambat. Hal ini menyebabkan bakteri lebih tidak sensitif terhadap antibiotik yang menargetkan pembelahan sel. Antibiotik juga tidak dapat mempengaruhi sel persister, yaitu subpopulasi sel dengan laju pertumbuhan nol atau sangat lambat. Sel bakteri juga dapat mengeluarkan toksin, termasuk antibiotik, keluar dari sel melalui *efflux pump* (Rabin *et al.*, 2015).

2.4.3 Uji Pembentukan Biofilm

2.4.3.1 Metode Tabung

Metode tabung merupakan metode kualitatif untuk mendeteksi biofilm yang dilakukan dengan cara mengamati garis biofilm yang terbentuk pada bagian dasar dan dinding tabung.

Pembentukan biofilm positif apabila terlihat garis pada dinding tabung dan di dasar tabung. Jumlah biofilm yang terbentuk dinilai dengan angka 1 apabila lemah/tidak terbentuk biofilm, 2 apabila sedang, dan 3 apabila kuat/tinggi (Kirmusaoglu, 2019).

2.4.3.2 Metode *Congo Red Agar*

Metode *Congo Red Agar* (CRA) termasuk metode deteksi biofilm secara kualitatif dengan cara mengamati perubahan warna pada koloni bakteri. Medium CRA terdiri dari *brain heart infusion broth* 37 g/L, sukrosa 50 g/L, agar nomor 1 10 g/L, dan indikator *Congo Red* 8 g/L. Bakteri diinokulasikan pada *plate* CRA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam keadaan aerob. Koloni pembentuk biofilm ditandai dengan koloni berwarna hitam dengan konsistensi Kristal kering. Sedangkan koloni bukan penghasil biofilm ditandai dengan warna pink atau merah (Kirmusaoglu, 2019).

2.4.3.3 Metode *Microtiter Plate* (MtP)

Metode *microtiter plate* termasuk metode kuantitatif yang merupakan baku emas dalam deteksi biofilm. Biofilm yang terbentuk diukur melalui *microplate reader* (microELISA). Metode ini dapat digunakan untuk skrining aktivitas agen antibiofilm terhadap biofilm yang dihasilkan oleh bakteri. Kontrol negatif yang berisi media digunakan sebagai blank. Nilai OD blank digunakan untuk mengidentifikasi apakah isolat menghasilkan biofilm. Apabila nilai OD isolate lebih tinggi daripada nilai OD blank, maka isolate digolongkan sebagai bakteri pembentuk biofilm (Kirmusaoglu, 2019).

2.4.3.4 Metode PCR

Metode PCR dapat dilakukan dengan *real-time* PCR, *conventional* PCR, atau *multiplex* PCR. Metode ini dapat mendeteksi apakah pada bakteri uji mengekspresikan *biofilm-associated gene* (Kirmusaoglu, 2019).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari - Maret 2025 di Laboratorium Taksa, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong – Bogor, Jawa Barat.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cawan petri, labu Erlenmeyer, tabung reaksi, loop inokulasi, mikropipet, tusuk gigi, *hotplate* dan *magnetic stirrer*, *vortex mixer*, *microcentrifuge*, inkubator, *thermal cycler*, mikrotip, Bio-Rad *Gel Doc™ EZ Imager*, Eppendorf *tube*, *gel tray*, sisir agar, *electrophoresis chamber*, *power supply*, *PCR plates 96-well*, *96-well microplate flat-bottom*, *microplate reader*, labu evaporator 50 ml, corong pisah.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi biji dan kulit buah kakao dari varietas kakao edel yang diambil dari perkebunan Alas Sukses Estate Treblasala, di daerah Banyuwangi, media *Tryptone Soya Agar (TSA)*, DMSO, *Nuclease Free Water (NFW)*, master mix (GoTaq® Green Master Mix, 2X, Promega, USA), Primer 27F dan 1492R, gel agarosa, VC 1kb DNA Ladder,

GelRed, *buffer* Tri-Asetat-EDTA (TAE) 10X, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), etil asetat, *Crystal violet* 0,1%, media *Tryptone Soya Broth* (TSB), *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Mueller Hinton Broth* (MHB).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Isolasi dan Pemurnian Bakteri Endofit

Isolasi bakteri endofit dilakukan dengan metode cawan gores (*streak plate*). Prinsip metode cawan gores yaitu mendapatkan koloni yang benar-benar terpisah dari koloni yang lain, sehingga mempermudah proses isolasi (Arini, 2016). Metode cawan gores menggunakan loop ose dan menggoreskannya ke permukaan media agar dengan pola tertentu (Mikdarullah dan Aditiya, 2017). Sampel dipreparasi dengan mengambil bagian biji dan kulit buah kakao kemudian diletakkan terpisah di dalam cawan petri yang kosong dan dibiarkan terlebih dahulu selama 1-2 hari. Selanjutnya dilakukan proses pengenceran berseri 10^{-1} sampai 10^{-4} untuk biji dan kulit kakao. Setelah itu, hasil pengenceran diinokulasikan ke masing-masing cawan petri berisi media TSA dengan metode cawan gores (*streak plate*). Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Dalam waktu 24 jam akan tumbuh koloni campuran bakteri yang berbeda bentuk dan warna. Koloni-koloni isolat bakteri yang tumbuh dari hasil isolasi kemudian dilakukan pemurnian di media TSA dan dilakukan berulang hingga diperoleh koloni bakteri murni yang tunggal (Mikdarullah dan Aditiya, 2017).

3.3.2 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA bakteri endofit dilakukan dengan metode *boiling* menggunakan alat *thermal cycler*. Teknik boiling menggunakan prinsip pemanasan suhu tinggi yang merusak permeabilitas dinding sel

(Pratiwi dkk., 2023). Metode pemanasan ini dapat mengekstraksi DNA bakteri yang memiliki struktur umum Gram positif dan Gram negatif pada suhu tertentu dan terbukti efisien (Adhyatma dkk., 2020). Metode *boiling* dengan *thermal cycler* pada penelitian ini dilakukan mengacu pada metode Sulistiyani dan Lisdiyanti. (2016) dengan sedikit modifikasi. Koloni tunggal dari isolat bakteri endofit murni pada permukaan media padat diambil menggunakan tusuk gigi steril dan disuspensikan ke dalam 20 μ l *natural free water* (NFW). Suspensi kemudian *dispindown* menggunakan alat *microcentrifuge* selama 30 detik dan dimasukkan ke dalam alat *thermal cycler* untuk menjalankan program *boiling* selama 10 menit pada suhu 98 °C, bertujuan untuk melisiskan sel dan memisahkan DNA dari protein.

3.3.3 Amplifikasi Gen 16S rRNA

Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan alat *thermal cycler*. DNA diamplifikasi menggunakan PCR kit GoTaq Green Master Mix 2x (Promega, USA) dengan komposisi bahan dan tahapan kondisi PCR dilakukan mengacu pada metode Sulistiyani dan Lisdiyanti. (2016) dengan sedikit modifikasi.

Tabel 1. Komposisi bahan amplifikasi gen 16S rRNA

Bahan	Jumlah
GoTaq Green Master Mix 2x	12,5 μ l
Primer 27F (10 μ M) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')	0,625 μ l
Primer 1492R (10 μ M) (5'-GTTTACCTTGTTACGACTT-3')	0,625 μ l
DMSO	0,5 μ l
<i>Nuclease Free Water</i> (NFW)	9,75 μ l
Sampel DNA	1 μ l
Total	25 μl

Amplifikasi dilakukan dengan kondisi PCR yang dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94°C selama 1 menit 30 detik kemudian dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 98,5 °C selama 30 detik, penempelan (*annealing*) pada suhu 55 °C selama 30 detik, dan pemanjangan (*extension*) pada suhu 72 °C selama 1 menit 30 detik. Setelah itu dilanjutkan dengan pemanjangan akhir (*final extension*) pada suhu 72 °C selama 10 menit.

3.3.4 Elektroforesis Produk PCR

Proses elektroforesis dilakukan mengacu pada metode Juwita dkk. (2024), dengan modifikasi. Elektroforesis menggunakan gel agarosa 1%. Gel agarosa dibuat dengan cara mencampurkan 1 gr agarosa, 49 ml aquades, dan 1 ml TAE *buffer* 1× yang dipanaskan hingga mendidih. Agarosa dibiarkan hingga menjadi hangat dan ditambahkan 2,5 µl GelRed. Campuran agarosa dengan GelRed dituangkan pada cetakan yang telah dipasang sisir pembuat sumuran isolat. Gel agarosa yang telah mengeras dimasukkan ke dalam *chamber* dan ditambahkan TAE *buffer* 1× sampai gel terendam. Sebanyak 2,5 µl DNA ladder 1kb dimasukkan ke dalam sumur pertama dan sebanyak 2,5 µl produk PCR ditambahkan ke dalam sumur berikutnya. Kemudian elektroda dihubungkan dengan *power supply* dengan tegangan 100 *volt* selama 25 menit. Gel agarosa divisualisasi menggunakan alat *gel doc* untuk dapat melihat hasil pencitraan dengan sinar ultraviolet yang akan divisualisasikan ke layar monitor dan didokumentasi.

3.3.5 Sekuensing Gen 16S rRNA

Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang telah diamplifikasi dan divisualisasi menggunakan mesin sekuensing DNA otomatis. Proses sekuensing dilakukan di PT Genetika Science Indonesia. Produk PCR dikirim dengan dimasukkan

ke PCR *plates* 96-well yang dilengkapi penutup. Beserta *silica gel* dimasukkan ke dalam kotak dan ditutup rapat. Hasil sekuensing DNA berupa urutan nukleotida gen 16S rRNA diolah menggunakan *software* BioEdit menjadi format FASTA (Karamoy dkk., 2017). Sekuens yang sudah diedit, selanjutnya dianalisis menggunakan *Basic Local Alignment Tools* (BLAST) di The National Center for Biotechnology Information (NCBI) yang dapat diakses melalui situs <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. (Wullur, 2023). Hasil BLAST akan menunjukkan kesamaan antara urutan nukleotida gen 16S rRNA bakteri yang ada pada GenBank (Karamoy dkk., 2017).

3.3.6 Analisis Filogenetik

Pensejajaran ganda (*multiple alignment*) dari semua sekuens gen 16S rRNA dilakukan dengan menggunakan Clustal-W pada perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versi ke-11 (MEGA11). *Multiple sequence alignment* (MSA) dilakukan dengan melibatkan sekuens gen 16S rRNA dan beberapa sekuens pembanding dari GenBank di website NCBI yang memiliki kemiripan berdasarkan hasil pencarian BLAST sebelumnya. Pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan metode statistik neighbor-joining dan model Maximum Likelihood dengan bootstrap 500. *Complete deletion* dipilih untuk mengatasi gap dalam pengolahan data (Maulida dan Lisa, 2024).

3.3.7 Kultur Mikroorganisme

Isolat bakteri endofit yang telah diidentifikasi dikultur kembali pada media TSA atau NA (Himedia) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Ginting dkk., 2020). Isolat bakteri patogen yang digunakan sebagai bakteri uji dikultur pada media MHA atau MHB untuk bakteri dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Rahman dkk., 2022).

3.3.8 Produksi Ekstrak Bakteri Endofit

Proses produksi ekstrak dari bakteri endofit dilakukan pada medium cair. Bakteri endofit dikultur pada 50 ml medium cair TSB atau NB di labu Erlenmeyer diinkubasi pada suhu 30 °C selama 72 jam. Medium cair yang telah ditumbuhkan bakteri endofit ditambahkan etil asetat perbandingan 1:1 v/v, kemudian dipindahkan ke dalam corong pisah dan diekstraksi dengan cara dikocok kuat dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan (ekstrak etil asetat dan air). Selanjutnya ekstrak yang diperoleh diuapkan untuk memisahkan pelarutnya. Penguapan dilakukan dengan membiarkan ekstrak selama 2 malam di dalam lemari asam atau hingga pelarut habis menguap sehingga didapatkan ekstrak kental bakteri dan digunakan untuk uji antibiofilm atau disimpan pada suhu 4 °C. Saat akan digunakan, ekstrak dilarutkan terlebih dahulu menggunakan larutan dimetilsulfoksida (DMSO) 50%. DMSO dipilih sebagai pelarut didasarkan pada kemampuan DMSO untuk melarutkan berbagai senyawa, khususnya peptide. Pelarut DMSO tidak memiliki kemampuan menghambat bakteri dan mampu melarutkan semua senyawa yang bersifat polar, non-polar, dan semipolar sehingga pelarut ini merupakan pelarut ekstrak yang baik karena tidak memberikan pengaruh dalam aktivitas penghambatan bakteri (Rizki dkk., 2021).

3.3.9 Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm

Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode *microtiter plate* (MtP). Pengujian mengacu pada Ulyah dkk. (2015) dengan beberapa modifikasi. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Bakteri uji penghasil biofilm diinokulasi ke dalam tabung reaksi kaca yang berisi medium Mueller Hinton Broth (MHB) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kultur cair *E. coli* disesuaikan dengan OD600 sebesar 1,0 atau

setara dengan 5×10^8 CFU/ml. Sementara kultur cair *S. aureus* disesuaikan dengan OD600 sebesar 0,4 atau setara dengan 2×10^8 CFU/ml (Kim *et al.*, 2015). Sebanyak 180 μ L medium cair MHB dan 20 μ L ekstrak uji dimasukkan ke dalam sumuran kolom 1. Sumuran kolom 2 dan seterusnya diisi dengan 100 μ L medium cair MHB. Kemudian 100 μ L cairan diambil dari kolom 1 dan dimasukkan ke kolom 2, dan seterusnya untuk membuat deret serial. Kemudian sebanyak 10 μ L suspensi bakteri uji ditambahkan ke dalam tiap sumur yang berisi medium cair dan ekstrak uji. Selanjutnya 90 μ L media cair ditambah 10 μ L kultur overnight bakteri uji dimasukkan ke dalam sumuran kontrol negatif. Sebanyak 90 μ L media cair yang mengandung antibiotik rifampisin dengan konsentrasi 0,2 mg/mL ditambah 10 μ L kultur overnight bakteri uji dimasukkan ke dalam sumuran kontrol positif. 100 μ L media cair yang mengandung DMSO 50% dimasukkan ke dalam sumuran kontrol pelarut. 100 μ L medium cair MHB dimasukkan ke dalam sumuran kontrol media.

Mikroplat ditutup dan diinkubasi selama 24 - 48 jam pada suhu 37 °C. Setelah inkubasi, isi sumuran dibuang secara hati-hati dengan bantuan mikropipet *multichannel* tanpa menyentuh bagian dinding atau dasar mikropipet kemudian dicuci dengan 200 μ L PBS sebanyak 2 kali dan dikeringkan. Setelah mikroplat kering, sebanyak 125 μ L pewarna kristal violet 0,1% dimasukkan ke dalam setiap sumuran supaya biomassa biofilm terwarnai dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10-15 menit. Isi mikroplat dicuci menggunakan PBS steril sebanyak 3-4 kali untuk menghilangkan sel yang terwarnai tetapi tidak menempel pada mikroplat. Mikroplat dibiarkan mengering pada suhu ruang. Sebanyak 125 μ L etanol absolut dimasukkan ke dalam tiap sumuran mikroplat untuk melarutkan kristal violet dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10-15 menit. Mikroplat diamati menggunakan alat *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Penghambatan pertumbuhan biofilm dihitung menggunakan rumus di bawah ini berdasarkan Kining dkk. (2025).

$$\% \text{ Penghambatan pertumbuhan biofilm} = \frac{OD_{kn} - OD_{uji}}{OD_{kn}} \times 100 \%$$

Keterangan:

OD_{kn} = Optical Density kontrol

OD_{uji} = Optical Density uji

3.3.10 Uji Penghancuran Biofilm

Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode *microtiter plate* (MtP). Pengujian mengacu pada metode Ramage *et al.* (2002) dengan beberapa modifikasi. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Bakteri uji penghasil biofilm diinokulasi ke dalam tabung reaksi kaca yang berisi medium Mueller Hinton Broth (MHB) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kultur cair *E. coli* disesuaikan dengan OD600 sebesar 1,0 atau setara dengan 5×10^8 CFU/ml. Sementara kultur cair *S. aureus* disesuaikan dengan OD600 sebesar 0,4 atau setara dengan 2×10^8 CFU/ml (Kim *et al.*, 2015). Suspensi bakteri uji ditumbuhkan dalam mikropelat dalam media MHB selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, supernatant dan sel planktonik dibuang secara hati-hati, kemudian dicuci dengan 200 µL PBS sebanyak 3 kali. Dengan menggunakan mikropelat yang lain, delusi serial senyawa uji dibuat. Sebanyak 100 µL medium cair MHB yang telah berisi konsentrasi senyawa uji ditambahkan ke tiap sumuran mikropelat yang telah ditumbuhi biofilm dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, larutan medium dibuang dan plate kemudian dicuci dengan 200 µL PBS sebanyak 3 kali.

Setelah mikropelat kering, sebanyak 125 µl pewarna kristal violet 0,1% dimasukkan ke dalam setiap sumuran supaya biomassa biofilm terwarnai dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10-15 menit. Isi mikropelat dicuci menggunakan PBS steril sebanyak 3-4 kali untuk

menghilangkan sel yang terwarnai tetapi tidak menempel pada mikroplat. Mikroplat dibiarkan mengering pada suhu ruang. Sebanyak 125 µl etanol absolut dimasukkan ke dalam tiap sumuran mikroplat untuk melarutkan kristal violet dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10-15 menit. Mikroplat diamati menggunakan alat *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Penghancuran biofilm dihitung menggunakan rumus di bawah ini berdasarkan Kining dkk. (2025).

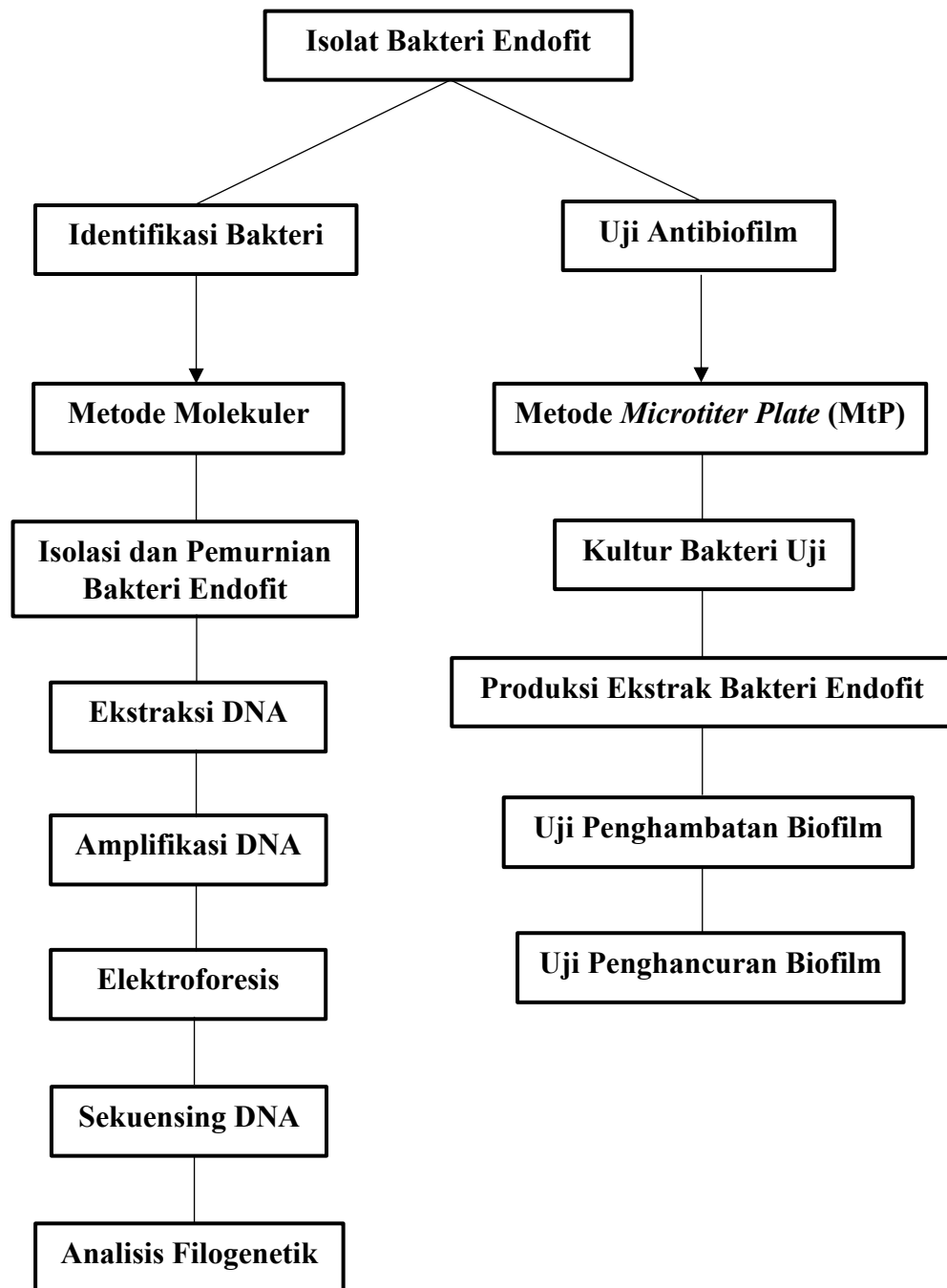
$$\% \text{ Penghancuran biofilm} = \frac{OD_{kn} - OD_{uji}}{OD_{kn}} \times 100 \%$$

Keterangan:

OD_{kn} = Optical Density kontrol

OD_{uji} = Optical Density uji

3.4 Diagram Alir Penelitian



Gambar 2. Diagram alir tahapan penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

1. Berdasarkan analisis molekuler gen 16S rRNA, 12 isolat bakteri endofit yang diperoleh dari buah kakao berhasil diidentifikasi, isolat K-01 identik dengan spesies *Cronobacter sakazakii*, isolat K-02 dan K-13 identik dengan spesies *Enterobacter cloacae*, isolat K-03 identik dengan spesies *Pantoea dispersa*, isolat K-08 identik dengan spesies *Priestia aryabhatai*, isolat K-10 identik dengan spesies *Klebsiella* sp, isolat K-11, K-16, dan K-17 identik dengan spesies *Enterobacter asburiae*, isolat K-19 identik dengan spesies *Acinetobacter populi*, isolat K-25 identik dengan spesies *Bacillus pseudomycoides*, dan K-29 identik dengan spesies *Bacillus amyloliquefaciens*.
2. Berdasarkan uji aktivitas antibiofilm, ekstrak isolat K-03, K-11, dan K-19 tidak menunjukkan aktivitas dalam menghambat pembentukan biofilm *E. coli* dan *S. aureus*. Namun, pada uji penghancuran biofilm, ekstrak isolat K-03 dan K-11 mampu menghancurkan biofilm *E. coli* pada beberapa konsentrasi tertentu, meskipun aktivitasnya tidak linier terhadap konsentrasi. Sedangkan ekstrak isolat K-19 tidak memiliki kemampuan dalam menghancurkan biofilm *E. coli*. Sementara itu, ketiga ekstrak isolat (K-03, K-11, dan K-19) menunjukkan aktivitas dalam menghancurkan biofilm *S. aureus* pada beberapa konsentrasi tertentu, meskipun aktivitasnya tidak konsisten dan tidak linier terhadap peningkatan konsentrasi. Beberapa isolat bakteri endofit dari buah kakao, khususnya K-03 dan K-11, memiliki potensi sebagai agen antibiofilm terhadap biofilm *E. coli* dan *S. aureus* pada konsentrasi tertentu.

5.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lanjutan untuk mengoptimalkan konsentrasi ekstrak bakteri endofit, khususnya isolat K-03 dan K-11, agar aktivitas antibiofilm yang dihasilkan menjadi lebih konsisten dan efektif terhadap biofilm *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.
2. Diperlukan penelitian lanjutan mengenai analisis senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak bakteri endofit.
3. Perlu dilakukan kajian lebih lanjut mengenai mekanisme kerja antibiofilm dari ekstrak isolat potensial sebagai dasar pengembangan agen antibiofilm untuk aplikasi di bidang medis, pangan, maupun pertanian.
4. Bagi peneliti selanjutnya dapat melakukan penelitian terkait potensi ekstrak bakteri endofit buah kakao sebagai agen hayati untuk pemacu pertumbuhan tanaman dan pengendalian penyakit pada tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah, E. M., Elhassan, G. M., & Mohammed, H. A. (2020). Antibacterial and Antibiofilm Activity of Plant-Derived Phenolic Compounds Against *Escherichia coli*. *Scientific African*, 8.
- Adha, S. D., & Ibrahim, M. (2021). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*. *LenteraBio*, 10, 140-145.
- Arsalan, A., Zubair, A., Ahmad, I., Shad, Z., & Ahmed, S. (2016). *Cronobacter sakazakii* : An Emerging Contaminant in Pediatric Infant Milk Formula. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(4), 17-22.
- Ashraf, M. A., Rasool, M., Zubair, M., & Iftikhar, Y. (2019). Plant Growth-Promoting *Klebsiella* sp. Isolated From Rhizospheric Soil of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Archives of Agronomy and Soil Science*, 65(6), 778-789.
- Attahmid, N. F. U., Abdul, R., & Muhammad, Y. (2021). Formulasi Minuman Imunomodulator dari Biji Kakao Pilihan Klon Sulawesi Barat dengan Penambahan Kayu Manis (*Cinnammomum cassia*). *Agrokompleks*, 21, 1-10.
- Babu, A. G., Kim, J. D., & Oh, B. T. (2015). Enhancement of Heavy Metal Stress Tolerance in Rice Plants by *Bacillus megaterium* Strain. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 233-239.
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2005). The Hormetic Dose–Response Model is More Common than the Threshold Model in Toxicology. *Toxicological Sciences*, 86(2), 327-329.
- Cechin, C. da F., Carvalho, G. G., Bastos, C. P., & Kabuki, D. Y. (2022). *Cronobacter* spp. in Foods of Plant Origin: Occurrence, Contamination Routes, and Pathogenic Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-15.
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., & Borriss, R. (2009). More Than Anticipated - Production of Antibiotics and Other Secondary Metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1-2), 14-24.

- Chrisnawati, S. D., Anindita, S., Oktavianto, E. J., & Diah. (2023). Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Rhizosfer dari Sedimen Mangrove Jenis *Rhizophora* sp di Ekosistem Mangrove Tapak, Semarang. *Jurnal Kelautan*, 16, 117-124.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial Biofilms: a Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- de Novais, D. P. S., Batista, T. M., Costa, E. A., & Pirovani, C. P. (2023). Genomic and Pathogenicity Mechanisms of The Main *Theobroma cacao* L. Eukaryotic Pathogens: A Systematic Review. *Microorganisms*, 11(6), 1567.
- El-Sayed, A. S. A., *et al.* (2020). Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Endophytic Fungi: an overview. *Frontiers in Microbiology*, 11, 561.
- Fakruddin, Md., Rahaman, Md. M., Ahmed, M. M., & Hoque, Md. M. (2013). *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*): An Emerging Foodborne Pathogen. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 4(6), 349-359.
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H. P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, and *B. siamensis* form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” Within The *B. subtilis* Species Complex. *Frontiers in Microbiology*, 8, 22.
- Farhanandi, B. W., & Indah, N. K. (2022). Karakteristik Morfologi dan Anatomi Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) yang Tumbuh pada Ketinggian Berbeda. *LenteraBio*, 11(2), 310-325.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The Biofilm Matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an Emergent Form of Bacterial Life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
- Ginting, L., Wijanarka., & Endang, K. (2020). Isolasi Bakteri Endofit Tanaman Pepaya (*Carica papaya* L.) Dan Uji Aktivitas Enzim Amilase. *Berkala Bioteknologi*, 3(2), 1-7.
- Gomes, R. C. R., Silva, T. R., Leão, T. L., Andrade, C. A., & Araújo, J. M. (2021). Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Endophytic Bacteria Isolated from *Theobroma cacao*. *Microbial Pathogenesis*, 150, 104705.
- Guinebretière, M. H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., ... & De Vos, P. (2013). Ecological Diversification in The *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology*, 15(2), 313-331.
- Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera,

- by phylogenomics and comparative genomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5753–5798.
- Hall, C. W., & Mah, T. F. (2017). Molecular Mechanisms of Biofilm-Based Antibiotic Resistance and Tolerance in Pathogenic Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276-301.
- Hamtini., Wida, N., Mellysa, R., Citra, T., Juli, R., & Shufiyani. (2022). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit pada Batang dan Daun Tanaman Songgolangit (*Tridax procumbens* (Lour.)). *Journal of Medical Laboratory Research*, 1(1), 19-22.
- Herman, Titik, S., & Opstaria, S. (2024). Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm Fraksi Ekstrak Daun Gamal (*Gliricidia sepium* (Jacq Walp) Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 10(1), 314-327.
- Kadju, T., Kristina, O. J. P., Maria, A. S. L. S., Maria, G. B. M., Aloysius, S. D. P. B., Karmelia, S. K. S., ... & Agustinus, R. A. E. (2022). Pemanfaatan Biji Kakao dalam Pembuatan Olahan Cokelat Di Desa Kotowuji Barat. *Jurnal Pengabdian Pada Masyarakat Indonesia*, 1(5), 11-15.
- Kämpfer, P., *et al.* (2005). *Enterobacter asburiae* sp. nov., a Species of The Family Enterobacteriaceae Isolated From Plant Materials. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1985-1988.
- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research*, 89(3), 205-218.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahmad, E. (2014). Role of Microbes in Plant Growth and Development. *Springer*.
- Kirmusaoglu, S. (2019). The Method for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Agents. *Antimicrobial, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*, IntechOpen, 1-17.
- Kovács, Á. T., Dragoš, A., & Kuipers, O. P. (2020). Exploring The Diversity of *Bacillus pseudomycoides*: From Harmless Soil Bacterium to Potential Antimicrobial Producer. *Microbial Biotechnology*, 13(4), 1047-1055.
- Kumar, C. G., Anand, S. K. (1998). Significance of Microbial Biofilms in Food Industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1-2), 9-27.
- Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). Chemical Ecology of Endophytic Fungi: origins of secondary metabolites. *Chemical Biology*, 19(7), 792-798.

- Kusumaningrum, H. D. *et al.* (2021). Antimicrobial Activity of Endophytic Bacteria from *Theobroma cacao* Against Foodborne Pathogens. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 9(1), 32-40.
- Kusumaningrum, H. D., Putri, S. P., & Nugraheni, N. (2021). Potential of Endophytic Bacteria Isolated from Medicinal Plants as Biofilm Inhibitors. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 26(2), 102-110.
- Le, K.Y., *et al.* (2014). Regulation of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 128-133.
- Leite, H. A. C., Silva, A. B., Gomes, F. P., Gramacho, K. P., Faria, J. C., de Souza, J. T., & Loguercio, L. L. (2013). *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* Endophytes From Healthy *Theobroma cacao* L. Trees Can Systemically Colonize Seedlings and Promote Growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2639-2651.
- Li, H., *et al.* (2016). Taxonomic Characterization and Genomic Insights of *Leclercia adecarboxylata*. *PLoS ONE*, 11(4), e0153252.
- Li, Y., Zhu, H., Li, Y., Zhang, Y., Zhang, W., Liu, H., ... & Zhang, Y. (2020). *Acinetobacter populi* sp. nov., Isolated From Symptomatic Bark of *Populus × euramericana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(8), 4420-4426.
- Liu, Y., *et al.* (2011). *Enterobacter cloacae* as a Biocontrol Agent of Plant Diseases: Mechanisms and Application. *Biological Control*, 56(1), 1-7.
- López-Román, J. M., Soto-Navarro, C. M. M., Carpena, J. J. G., Gomez, A. J. C., Cayuelas, A. B., Picó, I. B., ... & Fernandez, G. V. (2022). U.S. Patent Application No. 17/606,470.
- Lubis, N. A., Kiki, N., Rahmiati., & Ferdinand, S. (2024). Potensi Bakteri Endofit dari Akar Kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack) R. M. Smith) dalam Menghambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Biologi UMA*, 6(1), 75-83.
- Luo, H., Lin, S., Ren, Q., & Chen, Z. (2020). Anti-Biofilm Activity of Endophytic Bacterial Extract from *Artemisia annua* Against Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 176, 106030.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., & Sa, T. (2010). Characterization of *Enterobacter* sp. for Plant Growth Promoting Traits and Molecular Detection of *nifH* gene. *Current Microbiology*, 60(4), 217-223.
- Masrukhin., Ruby, S., Mia, K., & Sugiyono, S. (2021). Optimasi Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* Melalui Penambahan Glukosa dan NaCl. *Prosiding Biologi Achieving the Sustainable Development Goals with Biodiversity in Confronting Climate Change*, 7(1).

- Michael., & Waturangi, D. E. (2023). Antibiofilm Activity from Endophyte Bacteria, *Vibrio cholerae* Strains, and Actinomycetes Isolates in Liquid and Solid Culture. *BMC Microbiology*, 23(83), 1-11.
- Nira, R., Yue, Z., Clement, O. T., Yixuan, D., Eric, B., & Herman, O. S. (2015). Biofilm Formation Mechanisms and Targets for Developing Antibiofilm Agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493-512.
- Noer, S. (2021). Identifikasi Bakteri secara Molekular Menggunakan 16S rRNA. *EduBiologia*, 1(1), 1-6
- Nontji, M., Amran, M., & Farizah, D. A. (2022). Identifikasi Molekuler Menggunakan Gen 16S-rNA dan Seleksi Limbah Organik sebagai Carrier Terhadap Rhizobakteri Indigenus Asal Rhizosfer Padi Sawah. *Seminar Nasional dalam Rangka Dies Natalis ke-46 UNS*, 6(1), 983-993.
- Pakaya, M. S., Julianty, A., Dizky, R. P. P., Andi, M., & Ade, A. P. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit dari Akar Pare (*Momordica charantia* L.). *Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 4(1), 301-309.
- Panwar, M., Tewari, R., Gulati, A., & Nayyar, H. (2016). Indigenous Salt-Tolerant Rhizobacterium *Pantoea dispersa* (PSB3) Reduces Sodium Uptake and Mitigates The Effects of Salt Stress on Growth and Yield of Chickpea. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(12), 1-12.
- Rajamanikyam, M., Vadlapudi, V., & Amanchy, R. (2017). Endophytic Fungi as Novel Resources of Natural Therapeutics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60.
- Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., & Williams, C. (2012). Fungal Biofilm Resistance. *International Journal of Microbiology*.
- Riono, Y. (2020). Pertumbuhan Bibit Kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan Berbagai Pemberian Dosis Serbuk Gergaji Pada Varietas (Bundo-F1) di Tanah Gambut. *Jurnal Selodang Mayang*, 6(3), 163-171.
- Rutherford, S. T., Van Kessel, J. C., Shao, Y., & Bassler, B. L. (2011). AphA and LuxR/HapR Reciprocally Control Quorum Sensing in Vibrios. *Genes & Development*, 25(4), 397-408.
- Sari, I. J., Adhitya, P. P., Andi, H., Angel, W. T., Dyonisius, W., Stefanie., Venansi, V., Yoshua., & Nathalia, K. (2017). Identifikasi Jenis Mikroorganisme Pada Tanaman Kurma di Kawasan Tangerang. *Biospecies*, 10(2), 67-72.
- Sentenac, H., Loyau, A., Leflaive, J., & Schmeller, D. S. (2022). The Significance of Biofilms to Human, Animal, Plant and Ecosystem Health. *Functional Ecology*, 36(2), 294-313.
- Shahid, M., Mohammad, T. Z., Asad, S., Udai, B. S., Abdullah, M., Ali, H. B., Abdallah, M. E., & John, P. (2022). Stress-Tolerant Endophytic Isolate *Priestia aryabhatai* BPR-9 Modulates Physio-Biochemical Mechanisms in Wheat (*Triticum aestivum* L.) for Enhanced Salt Tolerance.

International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(10883).

- Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019). Antibiotics Versus Biofilm: an Emerging Battleground in Microbial Communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 76.
- Siddiqui, H., Ertürk, G., & Ceylan, A. (2021). Bacterial Biofilms and Natural Antibiofilm Agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(17), 6521-6536.
- Singh, B. N., Singh, B. R., Singh, R. L., Prakash, D., Dhakarey, R., Upadhyay, G., & Singh, H. B. (2021). Phytochemical Characterization and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Isolated From Tropical Medicinal Plants. *Journal of Mycology*
- Singh, R., Ray, P., Das, A., & Sharma, M. (2017). Penetration of Antibiotics Through *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(1), 89-92.
- Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding The Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *The Open Microbiology Journal*, 11, 53-62.
- Singh, V., *et al.* (2017). Anti-Biofilm Activity of Natural Compounds Against Bacterial Biofilms: A review. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2675.
- Singh, V., Mishra, A., Jha, B. (2017). Anti-Quorum Sensing and Antibiofilm Activity of *Delftia tsuruhatensis* Extract. *Microbial Pathogenesis*, 113, 109-117.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67(2), 257-268.
- Subashchandrabose, S., & Mobley, H. L. T. (2015). Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Eschericia coli*. *Microbiology Spectrum*, 3(4).
- Sukatik., Yuli, Y., Rahmi, H., Roni, T. P., & Ratih, P. (2020). Kajian Manfaat Senyawa Aktif dalam Ekstrak Kulit Buah Coklat (*Theobroma cacao*). *Jurnal Ilmiah Poli Rekayasa*, 15(2), 13-19.
- Suryanto, D., *et al.* (2020). Anti-Biofilm Activity of Endophytic *Bacillus subtilis* Isolated from Medicinal Plants Against *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, 147, 104429.
- Tan, L. T. H., Chan, K. G., Lee, L. H., & Goh, B. H. (2012). *Streptomyces* as a Prominent Resource of Future Anti-Biofilm Agents. *Frontiers in Microbiology*, 3, 282.
- Touchon, M., Cury, J., Yoon, E. J., Krizova, L., Cerqueira, G. C., Murphy, C., ... & Rocha, E. P. C. (2014). The Genomic Diversification of The Whole

- Acinetobacter* Genus: Origins, Mechanisms, and Consequences. *Genome Biology and Evolution*, 6(10), 2866-2882.
- Uthari, N. M., Lisa, S., & Liliek, S. H. (2017). Uji Potensi Antibakteri dan Antibiofilm Minyak Atsiri Umbi Teki (*Cyperus rotundus* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. *Journal of Pharmacy Science and Practice*, 4(2), 76-81.
- Vasavi, H. S., Arun, A. B., & Rekha, P. D. (2016). Biofilm Inhibitors from Marine Bacteria. *Marine Drugs*, 14(8), 137.
- Vikram, A., Jesudhasan, P. R., Jayaprakasha, G. K., Pillai, S. D., & Patil, B. S. (2010). Suppression of Bacterial Cell–Cell Signalling, Biofilm Formation and Type III Secretion System by Citrus Flavonoids. *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), 515–527.
- Vogeeler, P., Tremblay, Y. D., Mafu, A. A., Jacques, M., & Harel, J. (2014). Life on The Outside: Role of Biofilms in Environmental Persistence of Shigatoxin Producing *Eschericia coli*. *Frontiers In Microbiology*, 5, 1-12.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2009). Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules*, 14(7), 2535-2554.
- Zhang, L., & Birch, R. G. (1996). Biocontrol of Sugar Cane Leaf Scald Disease by an Isolate of *Pantoea dispersa* Which Detoxifies Albicidin Phytotoxins. *Letters in Applied Microbiology*, 22(2), 132-136.
- Zhao, J., Shan, T., Mou, Y., & Zhou, L. (2015). Plant-Derived Bioactive Compounds Produced by Endophytic Fungi. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(2), 159-168.