

Isolasi dan Uji Antagonisme Bakteri Endofit Tapak Dara (*Catharanthus Roseus*, L.) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Nurrizqi Oktavia¹⁾ dan Sri Pujiyanto¹⁾

¹⁾Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH Tembalang, Semarang, Indonesia
spujiyanto@undip.ac.id

ABSTRAK

Tapak dara (*C. roseus*) merupakan tanaman yang telah lama digunakan sebagai obat tradisional. Kandungan senyawa aktif dari tanaman tapak dara dapat diperoleh dengan mengisolasi bakteri endofit yang hidup di jaringan tubuh tanaman. Isolasi dilakukan dengan cara melakukan sterilisasi permukaan tanaman tapak dara dengan alkohol 70 % selama 2 menit, natrium hipoklorit 5.25% selama 2 menit, alkohol 70% selama 1 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak 4 kali. Eksplan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37° C selama 24-48 jam. Sebanyak 9 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari batang dan akar tanaman tapak dara. Isolat CC2 dan CR2 berbentuk kokus, isolat CC3 berbentuk batang, sementara itu isolat CC1, CC4, CR1, CR3, CR4, dan CR5 berbentuk rod. Kesembilan isolat yang diperoleh merupakan kelompok bakteri gram positif karena berwarna violet saat diwarnai dengan pewarna gram. Hasil uji antagonisme menunjukkan bahwa *E. coli* hanya dapat dihambat oleh isolat CC1 dan CR1 yaitu sebesar 1,5 dan 1 mm. Isolat CR3 memiliki zona penghambatan terbesar yaitu 3,75 mm terhadap *S. aureus*. Isolat CC3 menunjukkan zona penghambatan terkecil terhadap *S. aureus* yaitu sebesar 1 mm.

Kata Kunci: *Catharanthus roseus*, *E. coli*, endofit, *S. aureus*, uji antagonism

ABSTRACT

Tapak dara (*C. roseus*) has long been used as a traditional medicine. The active compound of this plant can be obtained from endophytic bacteria that live in plant tissues. The purpose of this study was to isolate endophytes from *C. roseus* and to test their ability to inhibit *E. coli* and *St. aureus*. Endophytic isolation began with surface sterilisation of plant samples with 70% alcohol and 5,25% sodium hypochlorite and sterile aquadest. The explants were then incubated at 37°C for 24-48 hours. A total of 9 isolates of endophytic bacteria were isolated from stem and root of *C. roseus*. Isolates CC2 and CR2 were coccus-shaped, whereas CC1, CC3, CC4, CR1, CR3, CR4, and CR5 were rod shaped isolates. The nine isolates obtained were Gram-positive bacteria. An antagonism test showed that *E. coli* could be inhibited by isolates CC1 and CR1 with a inhibition zone diameter were 1.5 and 1 mm. Isolate CR3 had the largest inhibition zone that was 3.75 mm to *St. aureus*.

Keywords: *Catharanthus roseus*, *E. coli*, endophytes, *St. aureus*, antagonism test.

1. Pendahuluan

Bakteri endofit merupakan bakteri yang secara alami hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan efek negatif. Beberapa jenis bakteri endofit dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri, antimalaria, dan antifungi (Purwanto dkk., 2014). Saat ini telah banyak dilakukan penelitian mengenai bakteri endofit untuk pencarian senyawa bioaktif baru. Keuntungan dari pemanfaat endofit ini adalah

kita dapat mendapatkan kandungan aktif suatu tumbuhan tanpa membutuhkan tumbuhan tersebut dalam jumlah banyak untuk digunakan sebagai simplisia.

Bakteri endofit dapat diisolasi dari berbagai jenis tumbuhan mulai dari monokotil hingga dikotil. Salah satu tanaman yang sudah lama digunakan sebagai obat adalah tapak dara (*Catharanthus roseus*). Tapak dara telah digunakan secara luas oleh masyarakat sebagai obat diabetes dan tekanan darah tinggi

(Kharwar *et al.*, 2008). Ekstrak dari tumbuhan ini juga diketahui memiliki aktivitas antimikroba.

Pencarian agen senyawa antibakteri baru yang berasal dari bahan alam perlu dilakukan mengingat semakin tingginya kasus resistensi bakteri terhadap senyawa antibakteri. Hal ini dapat menjadi peluang tanaman obat tradisional seperti tapak dara untuk dieksplorasi lebih jauh mengenai kandungan aktifnya. Senyawa antibakteri selain diperoleh dari ekstrak tanaman dapat pula diperoleh dari bakteri endofit yang hidup di jaringan tanaman tersebut. Hal ini karena bakteri endofit juga dapat menghasilkan senyawa yang sama seperti yang dihasilkan oleh inangnya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi bakteri endofit tapak dara dan mengetahui aktivitas antagonisme bakteri endofit tapak dara terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Pada penelitian ini uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan uji antagonis di mana isolat bakteri endofit yang diperoleh akan ditumbuhkan bersama bakteri uji pada cawan petri yang sama. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona bening pada media agar di sekitar isolat bakteri endofit.

2. Metode

2.1. Isolasi dan Pemurnian Bakteri Endofit

Tanaman tapak dara yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari lingkungan Universitas Diponegoro, Semarang. Sampel diambil kemudian dimasukkan ke dalam plastik sampel untuk selanjutnya dibawa ke laboratorium. Isolasi bakteri endofit tanaman tapak dara diawali dengan sterilisasi permukaan tanaman terlebih dahulu. Sterilisasi permukaan mengikuti metode Fisher *et al.* (1993) yang dimodifikasi. Tapak dara dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan debu dan kotoran yang menempel. Sampel selanjutnya dikering anginkan terlebih dahulu. Masing-masing bagian tapak dara (eksplan) yang digunakan dalam penelitian dicuci menggunakan alkohol 70% selama 2 menit, natrium hipoklorit 5, 25% selama 2 menit, dan alkohol 70% selama 1 menit. Selanjutnya sampel dibilas dengan aquades steril sebanyak 4 kali. Eksplan dikering anginkan kurang lebih 30 menit. Eksplan ditumbuk menggunakan

mortar dan diletakkan di cawan petri yang berisi media NA steril. Aquades bilasan terakhir dicawakan sebagai kontrol. Cawan petri kemudia diberi label dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 - 48 jam. Pengerjaan dilakukan secara aseptik di dalam LAF.

Bakteri endofit yang telah muncul selanjutnya dimurnikan dengan cara mengambil satu koloni bakteri endofit dan diinokulasikan ke media baru. Bakteri yang diambil adalah bakteri yang muncul atau tumbuh disekitar jaringan tanaman. Pemurnian dilakukan untuk mendapatkan isolat tunggal.

2.2. Karakterisasi Morfologi Bakteri Endofit

Karakterisasi morfologi dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati bentuk, elevasi, tepian serta warna koloni. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mengamati warna bakteri berdasarkan pewarnaan gram dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat.

2.3. Peremajaan Bakteri *E. coli* dan *S. aureus*

Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara menanam bakteri *E. coli* dan *S. aureus* ke dalam cawan petri yang berisi media NA steril. Isolat bakteri kemudian distreak pada medium yang telah tersedia, dilakukan di dalam LAF untuk menghindari terjadinya kontaminasi. Hasil peremajaan kemudian diinkubasi selama 24-48 jam di dalam inkubator.

2.4. Kultur Bakteri

Kultur bakteri dilakukan dengan cara menanam isolat bakteri endofit, *E. coli* dan *S. aureus* pada media NB steril. Kultur selanjutnya diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam di dalam inkubator dan diagitasi menggunakan *shaker*. Agitasi bertujuan supaya selama inkubasi terdapat aerasi dan bakteri dapat mengeluarkan metabolitnya ke dalam media.

2.5. Uji Antagonisme

Uji antagonisme diawali dengan penuangan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* sebanyak 100 µl ke dalam cawan petri yang berisi media MHA dan diratakan menggunakan *spreader*. Petri selanjutnya dibagi menjadi 4 ruang yaitu untuk kontrol positif, kontrol negatif, dan 2 isolat bakteri endofit. Kontrol positif menggunakan kloramfenikol, kontrol negatif menggunakan media NB steril. Paper disk sejumlah 4 buah untuk masing-masing petri ditetesi kloramfenikol, NB steril, dan isolat bakteri endofit sebanyak 20 µl. Petri selanjutnya diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam di dalam inkubator. Zona hambat diamati setelah inkubasi 24 jam. Perhitungan diameter zona hambat dilakukan berdasarkan metode Hidayat, dkk. (2014). Diameter zona hambat dihitung dari 4 sisi berbeda dan dibagi 4. Hasil pembagian selanjutnya dikurangi diameter kertas cakram.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Isolasi Bakteri Endofit

Bagian tanaman tapak dara yang digunakan sebagai eksplan adalah akar, batang, dan daun. Sterilisasi permukaan eksplan dilakukan dengan mencuci eksplan menggunakan alkohol 70% selama 2 menit, natrium hipoklorit 5, 25% selama 2 menit, dan alkohol 70% selama 1 menit. Selanjutnya sampel dibilas dengan aquades steril sebanyak 4 kali. Alkohol dan natrium hipoklorit berfungsi sebagai desinfektan untuk mensterilkan permukaan eksplan tapak dara dari mikroflora secara kimiawi. Efisiensi sterilisasi permukaan tanaman dilihat dari aquades bilasan terakhir yang dicawakan sebagai kontrol. Hal ini sesuai dengan Goryluk *et al.* (2009) yang mengatakan bahwa sterilisasi permukaan dikatakan berhasil apabila tidak terdapat pertumbuhan mikroorganisme pada cawan petri yang diberi bilasan terakhir sterilisasi permukaan. Koloni bakteri yang tumbuh pada jaringan eksplan tapak dara selanjutnya dimurnikan dengan cara mengambil satu koloni tunggal bakteri dan dikulturkan pada media baru. Pemurnian dilakukan sebanyak 3 kali untuk mendapatkan koloni tunggal.

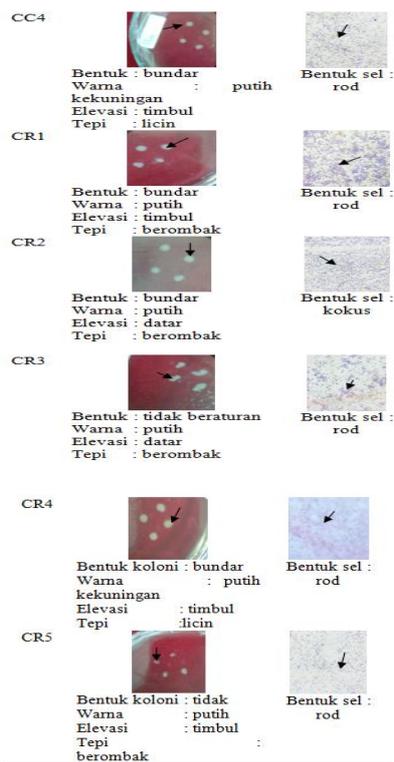
Berdasarkan isolasi yang telah dilakukan, diperoleh sebanyak 9 isolat bakteri endofit

tanaman tapak dara. Sebanyak 4 isolat bakteri endofit berasal dari eksplan batang yang diberi kode CC1, CC2, CC3, dan CC4. Sementara itu 5 isolat lainnya berasal dari eksplan akar yang diberi kode CR1, CR2, CR3, CR4, dan CR5. Pada eksplan daun, bakteri endofit tidak berhasil diisolasi menggunakan media NA. Jumlah perolehan isolat bakteri endofit ini seperti yang dikatakan oleh Balosi *et al.* (2014) bahwa populasi bakteri endofit lebih banyak terdapat pada akar dan menurun pada batang dan daun. Jumlah bakteri endofit di dalam tanaman tidak dapat ditentukan secara pasti (Purwanto dkk., 2014) namun dapat diisolasi dengan media agar. Bakteri endofit yang mampu diisolasi merupakan bakteri yang dapat beradaptasi dengan lingkungan baru.

3.2. Karakterisasi Morfologi Bakteri Endofit

Morfologi koloni bakteri pada media agar tergantung pada sejumlah faktor seperti media kultur, temperatur dan waktu inkubasi, usia kultur, dan jumlah sub kultur yang telah dilakukan. Parija (2012) mengatakan bahwa karakterisasi morfologi bakteri secara makroskopis dapat dilakukan dengan mengamati bentuk, elevasi, tepian, dan warna koloni. Hasil pengamatan makroskopis menunjukkan bahwa bentuk koloni bakteri endofit tapak dara didominasi oleh bentuk bulat dan hanya tiga isolat yang menunjukkan bentuk koloni tidak beraturan yaitu pada isolat CC3, CR3, dan CR5. Warna koloni didominasi oleh warna putih kecuali pada isolat CC3, CC4, dan CR5. Tepian koloni menunjukkan bentuk yang beragam yaitu licin, tidak beraturan, dan berombak. Elevasi atau ketinggian koloni sebagian besar timbul dan tiga isolat yaitu CC3, CR2, dan CR3 memiliki

Kode Isolat	Karakterisasi Morfologi	
	Makroskopis	Mikroskopis
CC1	 Bentuk koloni : bulat Warna : putih Elevasi : timbul Tepi : licin	 Bentuk sel : rod
CC2	 Bentuk : bulat Warna : putih Elevasi : timbul Tepi : licin	 Bentuk sel : kokus
CC3	 Bentuk : tidak beraturan Warna : putih Elevasi : datar Tepi : tidak beraturan	 Bentuk sel : basil



Gambar 1. Karakterisasi morfologi koloni isolat endofit tapak dara. Anak panah menunjukkan koloni bakteri pada karakterisasi morfologi makroskopis dan menunjukkan sel bakteri pada karakterisasi mikroskopis. Seluruh isolat merupakan gram positif karena berwarna violet setelah diberi pewarna gram. Pengamatan mikroskopis sel bakteri endofit pada perbesaran 1000 X menunjukkan bentuk sel kokus (CC2 dan CR2), basil (CC3), dan rod (CC1, CC4, CR1, CR3, CR4, dan CR5).

Pewarnaan gram bertujuan untuk membedakan bakteri gram positif dengan bakteri gram negatif. Lay (1994) mengatakan bahwa perbedaan hasil pewarnaan gram disebabkan oleh adanya perbedaan struktur dinding sel kedua kelompok bakteri tersebut yang menyebabkan terjadinya perbedaan reaksi permeabilitas zat pewarna. Bakteri gram positif adalah bakteri yang menolak dekolorisasi dan mempertahankan kompleks zat warna yodium primer yang tampak berwarna ungu. Bakteri ini memiliki dinding amorf yang relatif tebal dan asam protoplasma lebih banyak yang diyakini mampu mempertahankan pewarna violet dan kompleks yodium di dalam sel (Parijo, 2012). Bakteri gram negatif didekolorisasi oleh pelarut organik dan menyerap *counterstain* sehingga tampak berwarna merah. Agen dekolorisasi, seperti aseton atau etanol, yang digunakan selama

pewarnaan mengganggu amplop membran bakteri gram negatif, akibatnya zat warna dan yodium kompleks tercuci dari dinding bakteri gram negatif.

Berdasarkan pengamatan morfologi mikroskopis yang dilakukan, kesembilan isolat bakteri endofit tapak dara yang diisolasi merupakan kelompok bakteri gram positif karena sel bakteri nampak berwarna violet setelah diberi pewarna gram. Hal ini menunjukkan bahwa dinding sel bakteri tersebut tersusun oleh peptidoglikan. Perbedaan mencolok antara bakteri gram positif dan gram negatif terletak pada struktur dinding selnya. Dinding bakteri gram positif tersusun oleh peptidoglikan. Hal ini sesuai dengan Parija (2012) yang menyatakan bahwa dinding sel bakteri gram positif sebagian besar tersusun atas peptidoglikan yang muncul pada beberapa lapisan (*layer*) yang meliputi 40-80% berat kering dinding sel. Dinding sel bakteri gram positif mengandung asam *teichoic* dan *theicuronic*. Sementara dinding sel bakteri gram negatif relatif lebih tebal daripada dinding bakteri gram positif. Peptidoglikan pada bakteri gram negatif hanya 1-2 lapis dan hanya terdapat pada luar membran sel. Selain peptidoglikan, bakteri gram negatif memiliki tiga komponen utama pembentuk dinding sel yaitu lipoprotein, membran luar, dan lipopolisakarida.

Bentuk sel bakteri endofit tapak dara berdasarkan pengamatan mikroskopis tampak memiliki bentuk rod, kokus, dan basil. Bentuk sel didominasi oleh bentuk rod yaitu terdapat pada lima isolat. Bentuk kokus terdapat pada isolat CC2 dan CR2 sementara bentuk basil hanya terdapat pada isolat CC3.

3.3. Uji Antagonisme

Uji antagonisme dilakukan untuk mengetahui aktivitas isolat bakteri endofit tapak dara dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Uji ini dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri endofit dan bakteri target pada cawan petri yang sama. Aktivitas bakteri endofit dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus* ditunjukkan oleh adanya zona bening yang nampak menjauhi kertas cakram yang diberi bakteri endofit. Uji ini menggunakan dua kontrol yaitu kontrol positif menggunakan antibiotik kloramfenikol 0,01 g/10 ml dan kontrol negatif

menggunakan media NB steril. Kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif karena antibiotik ini memiliki spektrum yang luas yang mampu menghambat bakteri gram positif dan negatif.

Bakteri target yang digunakan dalam uji antagonisme ini adalah bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Bakteri *E. coli* merupakan bakteri gram negatif sehingga dipilih dalam penelitian ini untuk mewakili kelompok bakteri gram negatif sementara itu kelompok bakteri gram positif diwakili oleh *S. aureus*. Hal ini didukung pula oleh Fitri *et al.* (2010) yang mengatakan bahwa dalam pengujian kelompok bakteri gram positif dapat diwakili oleh *S. aureus* sementara bakteri gram negatif diwakili oleh *E. coli*.

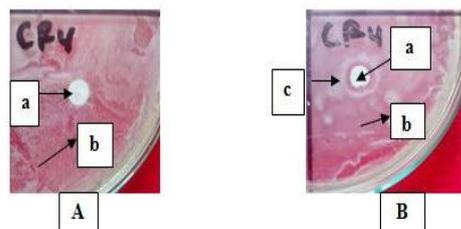
Tabel 1. Hasil Uji Antagonisme Bakteri Endofit Tapak Dara

Kode Isolat	Diameter Zona Hambat (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
CC1	1,5	0
CC2	0	3,5
CC3	0	1
CC4	0	0
CR1	1	1,5
CR2	0	2
CR3	0	3,75
CR4	0	2,5
CR5	0	2,25
Kontrol positif	25	18
Kontrol negatif	0	0

Penghambatan pertumbuhan bakteri target oleh bakteri endofit dapat terjadi karena bakteri endofit menghasilkan suatu senyawa yang bersifat antibakteri. Hasil uji antagonisme menunjukkan diameter zona hambat yang paling kecil adalah 1 mm dan yang terbesar adalah 3,75 mm. Isolat bakteri endofit tapak dara yang menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *E. coli* adalah isolat CC1 dan CR1 yaitu masing-masing sebesar 1,5 mm dan 1 mm. Sementara itu *S. aureus* dapat dihambat oleh isolat CC2, CC3, CR1, CR2, CR3, CR4, dan CR5. Zona hambat terbesar uji antagonis isolat endofit terhadap *S. aureus* adalah sebesar 3,75 mm yang dilakukan oleh isolat CR3. Pan, *et al.* (2009) menjelaskan

kategori penghambatan antimikroba berdasarkan diameter zona hambat yaitu 0-3 mm respon hambatan lemah, 3-6 mm respon hambatan sedang, dan >6 mm respon hambatan pertumbuhan kuat. Berdasarkan kategori tersebut, maka isolat bakteri endofit tapak dara yang memiliki kategori antibakteri sedang adalah CC2 dan CR3. Pada uji antagonisme, zona hambat yang terbentuk dapat dipengaruhi oleh beberapa hal seperti konsentrasi bakteri target, konsentrasi bakteri endofit yang diujikan, suhu dan waktu inkubasi, serta faktor lain seperti pH dan jenis medium yang digunakan.

Berdasarkan hasil uji antagonisme terlihat bahwa bakteri endofit gram positif memiliki aktivitas penghambatan yang lebih tinggi terhadap bakteri target dari gram positif dibanding dengan gram negatif. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Shukla *et al.* (2015) bahwa isolat bakteri endofit yang diisolasi dari batang tapak dara (CrS) dan daun (CrL) mampu menghambat *S. aureus* sementara *E. coli* hanya dihambat oleh isolat bakteri endofit CrS. Penelitian Kafur *et al.* (2011) yang menggunakan pelet bakteri endofit tapak dara menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *S. aureus* lebih dari 10 mm. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri gram negatif memiliki kemampuan pertahanan yang lebih baik saat terkena zat penghambat pertumbuhan dibandingkan dengan bakteri gram positif. Fitri *et al.* (2010) mengatakan bahwa bakteri gram negatif memiliki perlindungan yang lebih baik terhadap senyawa antimikroba dibandingkan dengan bakteri gram positif karena memiliki komponen dinding sel yang berbeda. Dinding sel bakteri gram positif relatif lebih tipis karena hanya tersusun oleh peptidoglikan dibanding dinding sel bakteri gram negatif yang tidak hanya tersusun oleh peptidoglikan namun tersusun pula oleh lipoprotein, membran luar, dan lipopolisakarida. Struktur dinding sel tersebut memungkinkan zat yang dihasilkan oleh isolat bakteri endofit tidak dapat masuk ke dalam sel bakteri gram negatif.



Gambar 2. Aktivitas antagonisme isolat bakteri endofit tapak dara. A merupakan uji antagonisme bakteri endofit dengan *E. coli* sedangkan B merupakan bakteri endofit yang diujikan dengan *S. aureus*. (a) merupakan kertas cakram yang diberi isolat bakteri endofit, (b) merupakan bakteri target, dan (c) merupakan zona hambat yang dihasilkan.

Senyawa antibakteri dapat menghambat pertumbuhan bahkan mematikan bakteri karena senyawa tersebut mampu menghambat sintesa dan metabolisme sel. Mekanisme penghambatan senyawa antibakteri secara umum meliputi mengganggu sintesis dinding sel, mengganggu fungsi membran, sintesis protein, sintesis asam nukleat, dan antimetabolit (Hugo and Russel, 2004).

4. Kesimpulan

Bakteri endofit tanaman tapak dara dapat diisolasi dengan cara melakukan sterilisasi permukaan eksplan menggunakan alkohol 70%, natrium hipoklorit 5,25%, dan dibilas dengan aquades steril. Eksplan selanjutnya ditempatkan dalam cawan petri berisi media NA dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24-48 jam hingga muncul koloni bakteri di sekitar jaringan eksplan. Berdasarkan uji antagonisme yang telah dilakukan, isolat bakteri CC1 dan CR1 mampu menghambat *E. coli* sebesar 1,5 dan 1 mm. Sementara itu isolat CC2, CC3, CR1, CR2, CR3, CR4, dan CR5 mampu menghambat *S. aureus* dengan diameter zona hambat sebesar 3,75 oleh isolat CR3.

Daftar Pustaka

Balosi, F., I. Lakani, dan J. Panggeso. 2014. Eksplorasi Bakteri Endofit sebagai Agen Pengendalian Hayati terhadap Penyakit Darah pada Tanaman Pisang secara In Vitro. *e-J. Arotekbis*. 2 (6): 579-586.

Fisher, P.J., O. Petrini, and B.C. Sutton. 1993. A comparative Study of Fungal

Endophytes in Leaves, Xylem, and Bark of Eucalyptus nitens in Australia and England. *Sydowia*. 45: 338-345.

Fitri, L. and B.M. Buatam. 2010. Screening of Antimicrobial Producing Strains Isolated from the Soil of Grassland Rhizosphere in Pocut Meurah Intan Forest Park, Seulawah, Aceh Besar. *Biodiversitas*. 11 (3): 129-132.

Goryluk, A., H.R. Burlaga, and Mblaszczyk. 2009. Isolation and Characterization of Bacterial Endophyte of *Chelidonium majus* L. *Polish Journal of Microbiology*. 58 (4): 255-261.

Hidayat, S., F. Hanum, dan A. Ismail. 2014. Efektivitas Daya Hambat dan Daya Bunuh Bakteri Ulkus Traumatikus pada Mukosa Mulut dengan Berbagai Konsentrasi Propolis (*Trigona* sp.). *Medali Jurnal*. 2 (1): 79-84.

Hugo and Russel. 2004. *Pharmaceutical Microbiology Seventh Edition*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.

Kafur, A., A.B. Khan. 2011. Isolation of Endophytic Actinomycetes from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don Leaves and Their Antimicrobial Activity. *Iranian Journal of Biotechnology*. 9 (4): 302-306.

Kharwar, R.N., V.C. Verma, G. Strobel, D. Ezra. 2008. The Endophytic Fungal Complex of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Research Communication*. 95 (2): 228-233.

Lay, B.W. 1994. *Analisa Mikroba di Laboratorium*. PT. Grafindo Persada, Jakarta.

Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., and Zhao, Z. 2009. The acid, Bile Tolerance and Antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Control* 20: 598-602.

Parija, S.C. 2012. *Microbiology and Immunology Second Edition*. Reed Elsevier India Private Limited, New Delhi.

Purwanto, U.M.S., F.H. Pasaribu, dan M. Bintang. 2014. Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Potensinya sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri. *Current Biochemistry*. 1 (1): 51-57.

Shukla, S., G. Naik, and S.K. Mishra. 2015. Potential Antimicrobial Activity of Bacterial Endophytes Isolated from

Flacourtia jangomas (Lour.) Raeusch, A
Less Explored Medicinal Plant. *Journal*

*Of Microbiology, Biotechnology, and
Food Sciences.* 4 (6): 473-477.