

**IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI PENGHASIL  
ZAT ANTIBAKTERI DARI CAIRAN KANTUNG  
TANAMAN KANTONG SEMAR (*Nepenthes ampullaria*,  
Jack)**

**LAPORAN PENELITIAN MANDIRI**

**Oleh:**

**Dra.Rr.Sulistiyarningsih, Apt.**



**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS PADJADJARAN  
BANDUNG  
2008**

## ABSTRAK

Telah dilakukan isolasi dan pemurnian bakteri dari cairan kantung tanaman kantong semar (*Nepenthes ampullaria*) yang menghasilkan tiga koloni bakteri, yaitu bakteri putih, ungu, dan kuning. Ketiga bakteri tersebut menghasilkan zat antibakteri yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis*, dengan aktivitas terbesar dihasilkan bakteri ungu. Bakteri putih dan ungu juga mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Eschericia coli*, dengan aktivitas terbesar dihasilkan oleh bakteri ungu. Hasil identifikasi melalui pengamatan fenotip melalui morfologi koloni, pengamatan mikroskopis (dengan pewarnaan Gram, spora dan kapsul) menunjukkan bahwa bakteri putih dan ungu termasuk genus *Bacillus* serta bakteri kuning termasuk genus *Clavibacter/Microbacterium*. Hasil homologi fragmen 16S rDNA dengan *data base* 16S rDNA menunjukkan bahwa bakteri putih mempunyai kemiripan tertinggi dengan *Bacillus thuringiensis* serotype H46.

Kata kunci: *Nepenthes ampullaria*, Antibakteri, Pengamatan fenotip, 16S rDNA

## **ABSTRACT**

*Isolation and Purification bacteria from pitcher plant (Nepenthes ampullaria) fluid had been done which shown three colonies bacteria, that is white, purple and yellow color bacteria. The three kinds bacteria produce an antibacterial, the antibacterial have an antibacterial activity againts Bacillus subtilis, purple bacteria show the greatest activity. White and purple bacteria have anti bacterial activity againts Eschericia coli too, the result is same purple bacteria show the greatest activity. The result of identification by fenotype observation through colonies morphology, microscopic observation (with Gram, spore, and capsule coloration) Shown white and purple included in Bacillus genera, and yellow bacteria included in Clavibacter/Microbacterium genera. The result of fragment 16S rDNA homology show that white bacteria have a high identical with Bacillus thuringiensis serotype H46.*

*Key words: Nepenthes ampullaria, Antibacterial, Phenotype observation, 16S rDNA*

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadiran dan limpahan rahmat dari Allah S.W.T. sehingga penelitian yang berjudul “Identifikasi Isolat Bakteri Penghasil zat Antibakteri dari Cairan Kantung Tanaman Kantong Semar (*Nepenthes ampullaria*, Jack)”

Penelitian ini tidak lepas dari peran berbagai pihak yang telah membantu penelitian dari awal hingga akhir pelaksanaan. Untuk itu, sebagai bentuk penghargaan perkenankanlah peneliti untuk mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Anas Subarnas, M.ScApt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran.
2. Dra. Dewi Rusmiati, Apt. , selaku kepala Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, yang telah memberikan bantuan dan pengarahan dalam penelitian ini.

Kami menyadari bahwa dalam penulisan laporan penelitian ini masih terdapat kekurangan, karena itu kami mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Akhir kata penulis berharap semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat.

Jatinangor, Agustus 2008

Penyusun

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>ABSTRAK</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	iii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	iv
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	vii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	viii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	x
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	3
2.1 Tanaman Kantong Semar.....	3
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Tanaman.....	3
2.1.2 Struktur dan Komponen cairan kantung semar.....	5
2.2 Antibiotik.....	8
2.2.1 Bakteri Penghasil Antibiotik.....	8
2.2.2 Uji Aktivitas Antibiotika .....	10
2.3 Identifikasi Bakteri Penghasil Antibiotik.....	11
2.3.1 Pengamatan Morfologi .....	12
2.3.2 Pengamatan Mikroskopis.....	12
2.3.3 Uji Biokimia.....	14

2.3.4 Penentuan Urutan 16S rDNA Dengan Metode PCR- <i>Sequencing</i> .....	19
<b>BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....</b>	<b>29</b>
3.1 Tujuan Penelitian .....	29
3.2 Manfaat Penelitian .....	29
<b>BAB IV BAHAN, ALAT, DAN METODE PENELITIAN .....</b>	<b>30</b>
4.1 Bahan .....	30
4.1.1 Sampel Uji.....	30
4.1.2 Bahan Kimia.....	30
4.2 Alat.....	31
4.3 Metode Penelitian.....	32
4.3.1 Isolasi dan Pemurnian Bakteri dari Cairan Kantung Tanaman Kantong Semar.....	32
4.3.2 Fermentasi Isolat Bakteri.....	32
4.3.3 Penyiapan Bakteri Uji.....	33
4.3.4 Pengujian Aktivitas Antibakteri Supernatan Hasil Fermentasi Terhadap Bakteri uji.....	33
4.3.5 Identifikasi Isolat Bakteri Penghasil Senyawa Antibakteri.....	33
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>42</b>
5.1 Hasil Isolasi dan Pemurnian Bakteri dari Cairan Kantung Tanaman Kantong Semar .....	42
5.2 Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Supernatan hasil Fermentasi Bakteri Terhadap Bakteri Uji .....	42
5.3 Hasil Identifikasi Isolat Bakteri Penghasil Senyawa Antibakteri.....	43

5.3.1 Hasil Pengamatan Morfologi koloni.....	43
5.3.2 Hasil Pengamatan Mikroskopik.....	44
5.3.3 Hasil Identifikasi Berdasarkan Uji Biokimia.....	44
5.3.4 Hasil Identifikasi Salah Satu Bakteri Penghasil Antibakteri melalui penentuan urutan 16S DNA.....	48
<b>BAB VI SIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>53</b>
6.1 Simpulan.....	53
6.2 Saran.....	53
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>55</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>58</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
5.1	Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Supernatan Hasil Fermentasi terhadap Bakteri Uji.....	42
5.2	Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Isolat Bakteri Penghasil Antibakteri.....	43
5.3	Hasil Pengamatan Mikroskopik Isolat Bakteri Penghasil Antibakteri.....	44
5.4	Hasil Uji Biokimia dari Isolat Bakteri.....	45
5.5	Hasil Perbandingan Hasil Identifikasi Isolat Bakteri dengan Informasi dari <i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i> .....	47
5.6	Hasil BLAST Urutan Fragmen 16S rDNA Isolat Salah Satu Bakteri Penghasil Antibakteri (bakteri putih) terhadap <i>data base</i> 16S rDNA.....	51



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Gambar <i>Nepenthes ampullaria</i> .....	6
2.2 Beberapa zone dalam kantung dari tanaman kantong semar.....	7
2.3 Kurva pertumbuhan bakteri.....	10
2.4 Uji aktivitas antibiotika melalui metode difusi agar.....	12
2.5 Reaksi oksidasi triptofan oleh enzim triptofanase.....	17
2.6 Reaksi pembentukan warna oleh pereaksi Kovac.....	17
2.7 Reaksi fermentasi sitrat secara enzimatik.....	18
2.8 Reaksi fermentasi glukosa dalam media MR menjadi asam campuran.....	19
2.9 Reaksi fermentasi glukosa dalam medium VP menjadi senyawa non-asam.....	20
2.10 Deteksi senyawa asetilmetilkarbinol menggunakan pereaksi Barrit .....	20
2.11 Tahap-tahap amplifikasi DNA melalui metode <i>Polymerase Chains Reactions</i> (PCR).....	26
2.12 Proses pembentukan DNA baru secara eksponensial.....	27
2.13 Sekuensing suatu fragmen DNA menggunakan metode <i>dye terminator labeling</i> .....	29
5.1 Hasil isolasi bakteri dari cairan kantung tanaman kantong semar ( <i>Nepenthes ampullaria</i> ).....	58
5.2 Biakan murni isolat bakteri dari cairan kantung tanaman kantong semar( <i>Nepenthes ampullaria</i> ).....	59
5.3 Hasil pengujian aktivitas antibakteri supernatan hasil fermentasi terhadap <i>E. coli</i> .....	60

5.4	Hasil pengujian aktivitas antibakteri supernatan hasil fermentasi terhadap <i>B. substillis</i> .....	60
5.5	Hasil pewarnaan Gram dari bakteri Putih.....	61
5.6	Hasil pewarnaan spora dari bakteri putih.....	61
5.7	Hasil pewarnaan kapsul dari bakteri putih.....	61
5.8	Hasil pewarnaan Gram dari bakteri ungu.....	62
5.9	Hasil pewarnaan spora dari bakteri ungu.....	62
5.10	Hasil pewarnaan kapsul dari bakteri ungu.....	62
5.11	Hasil pewarnaan Gram dari bakteri kuning.....	63
5.12	Hasil pewarnaan spora dari bakteri kuning.....	63
5.13	Hasil pewarnaan kapsul dari bakteri kuning.....	63
5.14	Hasil identifikasi bakteri putih melalui uji biokimia.....	64
5.15	Hasil identifikasi bakteri ungu melalui uji biokimia.....	65
5.16	Hasil identifikasi bakteri kuning melalui uji biokimia.....	66
5.17	Elektroforegram hasil amplifikasi gen 16S rDNA dari isolat salah satu bakteri penghasil antibakteri (bakteri putih).....	49
5.18	Hasil penentuan urutan (sekuensing) fragmen 16S rDNA dari isolat salah satu bakteri penghasil antibakteri (bakteri putih) .....	50
5.19	Gambar <i>Allignment</i> pasangan basa antara bakteri sampel dengan <i>Bacillus thuringiensis serotype H46</i> hingga urutan protein ke 600 pb.....	52
5.20	Hasil penentuan urutan (sekuensing) fragmen 16S rDNA dari salah satu bakteri koloni putih penghasil antibiotik.....	68

## DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN		Halaman
1	ISOLASI KOLONI TUNGGAL BAKTERI DALAM CAIRAN KANTONG SEMAR.....	58
2	PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIBIOTIKA.....	60
3	IDENTIFIKASI BAKTERI UJI.....	61
4	UJI BOKIMIA.....	64
5	HASIL PCR, SEKENSING DAN <i>BLAST</i> .....	67

# BAB I

## PENDAHULUAN

Kantong semar (*Nepenthes sp.*) merupakan tumbuhan yang mampu mencerna serangga yang terjebak dalam kantung pada ujung sulur daunnya, sehingga dapat digolongkan dalam tumbuhan insektivora. Serangga tersebut dijadikan sebagai sumber nutrisi, terutama sebagai sumber protein dan nitrogen, yang tidak didapatkan tumbuhan tersebut dari tanah yang menjadi habitatnya (Mansur, 2006).

Cairan dalam kantung tanaman kantong semar mengandung berbagai enzim, antara lain protease (paling dominan) dan nepentesin yang berfungsi mencerna serangga. Keasaman cairan tersebut (pH 2,8-4,9) juga membantu proses penguraian serangga (Witarto, 2006).

Penelitian dari Canon *et al.* (1980) menunjukkan adanya aktivitas antimikroba dari cairan kantung dan ekstrak daun kantong semar. Zat antimikroba tersebut telah diidentifikasi sebagai senyawa-senyawa golongan kinin, diantaranya plumbagin, droseron, dan hidroksidroseron. Selanjutnya diidentifikasi adanya empat senyawa baru dari golongan kinin, yaitu *nepenthon-A*, *nepenth-one-B*, *nepenthon-C* and *nepenthon-E*, dari ekstrak akar dan daun *Nepenthes rafflesiana*.

Dari hasil analisis *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms* (T-RFLP) dan *Amplified Ribosomal DNA Analysis* (ARDRA), ditemukan komunitas bakteri yang kompleks dalam cairan kantung tanaman kantong semar.

Komunitas bakteri tersebut memiliki indeks keragaman yang tinggi diantara berbagai spesies kantong semar, antara lain *N. rafflesiana* dan *N. ampularia*. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa bakteri ini tidak berasal dari komunitas bakteri filosfer daun, tetapi komunitas yang terbentuk seiring dengan terbuka-tertutupnya kantung (Yogiara dkk., 2006).

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Tanaman Kantong Semar**

##### **2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Tanaman**

Kantong semar (*Nepenthes sp.*) merupakan tumbuhan yang mampu mencerna serangga yang terjebak dalam kantong pada ujung sulur daunnya, sehingga digolongkan dalam tumbuhan karnivora. Ada juga yang menggolongkannya ke dalam tumbuhan insektivora, karena serangga lebih sering terperangkap ke dalam kantong tumbuhan ini. (Mansur, 2006).

Kata *Nepenthes* berasal dari bahasa Latin, yang berarti gelas anggur. Nama tersebut pertama kali digunakan oleh J.P. Bryne (1689), ketika membuat deskripsi berbagai jenis tumbuhan yang berasal dari Srilangka. Kantong semar termasuk pada divisi Magnoliophyta, kelas Magnoliopsida, ordo Caryophyllales, keluarga Nepenthaceae dan genus *Nepenthes*. Beberapa spesies kantong semar diantaranya *Nepenthes bicalcarata*, *N. ampullaria* dan *N. rafflesiana* (Higashi *et al.*, 1992).

Seperti kebanyakan tumbuhan karnivora lainnya, kantong semar tumbuh di tanah yang miskin unsur hara, seperti di tanah kapur, tanah berpasir, tanah merah, dan tanah gambut. Pada umumnya, jenis tanah tersebut kekurangan unsur nitrogen dan fosfor. Kekurangan unsur hara menyebabkan tumbuhan tersebut mengubah ujung sulur daunnya menjadi kantong untuk menangkap serangga atau binatang kecil sebagai sumber nutrisinya. Sulur daunnya dapat mencapai

permukaan tanah atau menggantung pada cabang-cabang ranting pohon yang berfungsi sebagai pipa penyalur nutrisi dan air. (Mansur, 2006).

Pada umumnya, kantung pada tumbuhan kantong semar memiliki tiga bentuk (Mansur, 2006), yaitu :

1. Kantung roset, yaitu kantung yang keluar dari ujung daun roset.
2. Kantung bawah, yaitu kantung yang keluar dari daun yang terletak tidak jauh atau menyentuh permukaan tanah. Selain ujung sulurnya berada di bagian depan bawah kantung, kantung ini memiliki dua sayap yang berfungsi sebagai tangga untuk membantu serangga tanah naik ke mulut kantung.
3. Kantung atas, yaitu kantung berbentuk corong atau silinder, tidak memiliki sayap dan ujung sulur berada di belakang bawah kantung. Bentuk ini difungsikan untuk menangkap serangga terbang.

Selain dikenal sebagai tanaman hias yang unik, cairan dalam kantung muda yang masih menutup juga digunakan sebagai obat tradisional. Cairan tersebut digunakan sebagai obat mata, obat batuk dan obat luka bakar. Kulit dan perasan daun tumbuhan ini juga digunakan sebagai astringen, sedangkan rebusan akarnya digunakan sebagai obat sakit perut atau disentri, obat batuk, dan demam.

*N. ampullaria* merupakan spesies kantong semar dengan kantung berbentuk bulat atau menyerupai telur, dengan tinggi kantung sekitar 10 cm. Kantung-kantung ini biasanya berkumpul pada bagian dasar tanaman yang dekat dengan permukaan tanah, sebagian lainnya terdapat pada ujung-ujung daun. Bagian tutup kantung panjang, tipis, serta agak jauh dari mulut kantung, agar tidak mengganggu penghantaran nutrisi yang berasal dari hewan kecil atau serangga. Tanaman ini umumnya tumbuh di tempat terbuka, lapangan luas dan datar, serta

di tanah-tanah yang basah pada ketinggian 0-100 m dpl. *N. ampullaria* banyak ditemukan di daerah Sumatera, Kalimantan dan, Irian Jaya, terutama pada habitat hutan kerangas, hutan rawa gambut, hutan rawa pinggir sungai, sawah dan semak belukar (Higashi *et al.*, 1992).

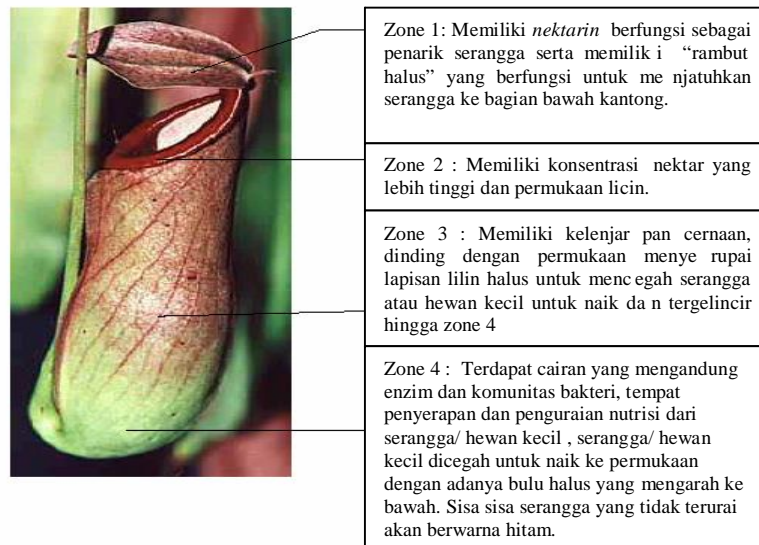


Gambar 2.1 Tanaman kantong semar *Nepenthes ampullaria* (Higashi *et al.*, 1992)

### 2.1.2 Struktur dan Komponen Cairan Kantung

Permukaan bagian dalam kantong daun dilapisi oleh lilin kristal (*crystal wax*) yang membuat serangga atau binatang kecil tergelincir masuk dan tidak mampu keluar dari kantong. Penelitian terhadap struktur lilin menggunakan mikroskop elektron menunjukkan adanya platelet lilin yang menonjol tegak lurus terhadap permukaan. Pemeriksaan karakter fisikokimia menunjukkan lilin tersebut tersusun dari campuran polimer alifatik yang didominasi rantai aldehid yang sangat panjang. (Riedel *et al.*, 2003).





Gambar 2.2 Beberapa zone dalam kantong dari tanaman kantong semar (Yun Chan *et al.*, 2005)

Kelenjar dalam dinding kantong di zona pencernaan menghasilkan enzim proteolase (protease/peluruh protein), yang sering juga disebut nepentesin. Enzim ini digunakan untuk menguraikan protein dari serangga atau binatang lain menjadi zat-zat yang lebih sederhana, seperti nitrogen, fosfor, kalium dan garam-garam mineral. Aktivitas enzim proteolase sangat dipengaruhi oleh pH (keasaman) cairan kantong yang umumnya di bawah 4,0 (Plummer, 1963).

Adanya perubahan pH, ion amonium dan keragaman dalam populasi bakteri berpengaruh terhadap proses penguraian dalam kantong. Di dalam cairan ditemukan adanya aktivitas yang kuat dari asam, alkali fosfat, fosfoamidase, esterase C4 dan esterase C8. Eksresi sebuah proton (ion  $H^+$ ) dari ion  $NH_4^+$  akan menyebabkan pH cairan menurun sampai pH optimum dari protease, lalu proses pencernaan makanan dalam kantong akan berlangsung (Higashi *et al.*, 1992).

Dari hasil analisis *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms* (T-RFLP) dan *Amplified Ribosomal DNA Analysis* (ARDRA), ditemukan komunitas bakteri yang kompleks dalam cairan kantung semar. Komunitas bakteri tersebut memiliki indeks keragaman yang tinggi diantara berbagai spesies kantong semar, antara lain *N. rafflesiana* dan *N. ampullaria*. Sekitar 26 galur bakteri telah diisolasi dari 4 spesies kantong semar, 10 galur diantaranya merupakan bakteri Gram positif, sedang 16 galur lainnya adalah bakteri Gram negatif (10 galur diantaranya memiliki aktivitas hidrolisis kasein). Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa bakteri ini tidak berasal dari komunitas bakteri filosfer daun, tetapi terbentuk seiring dengan terbuka-tertutupnya kantong (Yogiara *et al.*, 2006).

Selain bakteri, terdapat mikroba lain dalam cairan kantung tanaman kantong semar, diantaranya ragi dan jamur. Ragi dan jamur yang diisolasi dari cairan kantung adalah *Aureobasidium pullulans*, *Bullera alba*, *Candida diffluens*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula rubra*, *Sporobolomyces roseus*, *Tilletiopsis* sp. dan *Trichosporon pullulans*. Pada kantong semar dari daerah Malaysia Barat ditemukan ragi dominan berupa *Cryptococcus albidus* (Shivas, 1989).

Penelitian dari Canon *et al.* (1980) menunjukkan adanya aktivitas antimikroba dari cairan kantung dan ekstrak daun kantong semar. Zat antimikroba tersebut telah diidentifikasi sebagai senyawa-senyawa golongan kinin, diantaranya plumbagin, droseron, dan hidroksidroseron. Selanjutnya diidentifikasi adanya empat senyawa baru dari golongan kinin, yaitu *nepenthon-A*, *nepenth-one-B*, *nepenthon-C* and *nepenthon-E*, dari ekstrak akar dan daun *N. rafflesiana*. Sampai saat ini, belum diketahui apakah zat antimikroba tersebut dihasilkan oleh tanaman

atau oleh komunitas bakteri yang terdapat dalam cairan kantung tanaman kantong semar (Canon *et al.*, 1990).

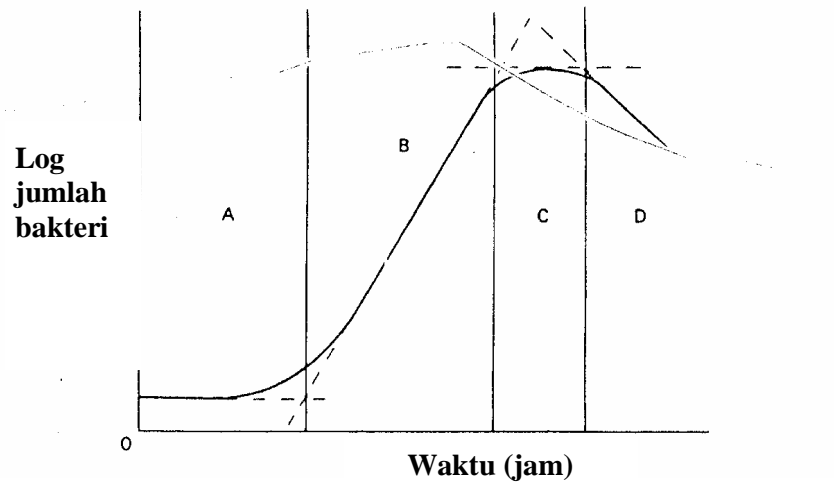
## **2.2 Antibiotika**

Antibiotika adalah suatu metabolit sekunder yang dihasilkan organisme tertentu, yang dalam jumlah kecil mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan organisme lain (Ganiswara, 1995). Antibiotika dapat diklasifikasikan kembali menjadi antibakteri, anti jamur, anti amoeba dan lain lain (Jawetz *et al.*, 1991). Beberapa antibiotik diperoleh dari berbagai mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan yang ekstrim, seperti daerah dengan suhu tinggi, suhu rendah, laut bagian dalam, padang pasir, lapisan es, sumber air panas dan minyak. Mikroorganisme penghasil antibiotik ini terdiri dari beberapa genus bakteri dan jamur, seperti *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Actinomycetes* dan *Bacillus* (Crueger, 1984).

### **2.2.1 Bakteri Penghasil Antibiotika**

Beberapa spesies dari genus *Bacillus* menghasilkan antibiotika dari golongan polipeptida, antara lain polimiksin oleh *B. polymoxa* dan basitrasin oleh *B. substilis*. Antibiotik-antibiotik ini memiliki aktivitas yang tinggi terhadap bakteri Gram negatif (Madigan *et al.*, 1997).

Bakteri memproduksi antibiotika pada fase stasioner dalam siklus kehidupannya, karena pada fase ini mulai terjadi persaingan untuk mendapatkan nutrisi. Untuk memenangkan persaingan, bakteri memproduksi antibiotik untuk menghambat/membunuh pertumbuhan mikroorganisme lainnya (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Kurva pertumbuhan bakteri (Crueger,1984)

Pada Gambar 2.3, di fase awal (A) atau fase lag terjadi penyesuaian bakteri terhadap lingkungan sekitarnya dengan jumlah bakteri cenderung tetap. Pada fase kedua (fase B) atau fase *log*, biakan bakteri sudah beradaptasi dengan lingkungannya dan mulai berkembang biak dengan cepat. Adanya nutrisi yang cukup akan membuat penambahan jumlah bakteri berlangsung dengan kecepatan logaritmik. Pada fase ketiga (fase C) atau fase stasioner, bakteri mulai bersaing untuk mendapatkan nutrisi dan produksi antibiotika dimulai. Sedangkan pada fase terakhir (fase D) atau fase kematian, bakteri mengalami kekurangan nutrisi serta keracunan sel, yang disebabkan antibiotik/senyawa toksik yang dihasilkan bakteri lain. Pada fase ini terjadi penurunan jumlah sel bakteri yang ditunjukkan oleh penurunan kurva (Hugo & Russel, 2004).

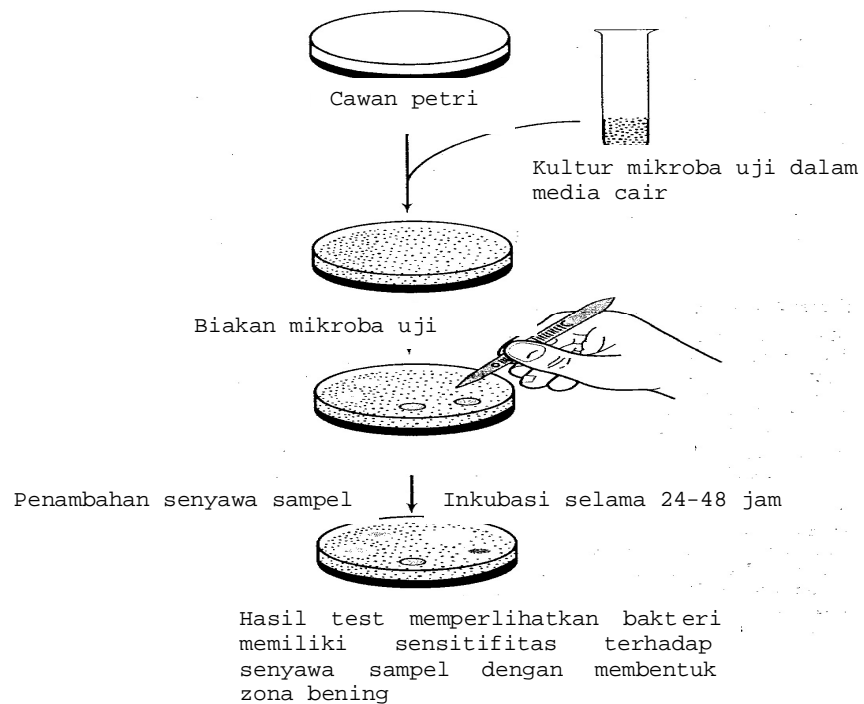
Untuk mengisolasi antibiotika, umumnya bakteri penghasil antibiotika ditanam (difermentasi) dalam medium cair tertentu sampai fase stasionernya.

Proses fermentasi bakteri harus berlangsung pada kondisi optimal, baik kondisi nutrisi maupun kondisi lingkungannya. Supernatan dari cairan fermentasi dipisahkan dari sel bakteri melalui berbagai metode, seperti sentrifugasi, filtrasi atau melalui pengendapan (Stanbury *et al.*, 1994).

Antibiotika dalam supernatan cairan fermentasi diisolasi melalui berbagai metode pemisahan, antara lain melalui proses ekstraksi, adsorpsi atau kromatografi. Proses ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi cair-cair berdasarkan perbedaan kepolaran suatu zat. Proses kromatografi yang digunakan untuk mengisolasi antibiotika dapat berupa kromatografi adsorpsi atau kromatografi penukar ion. Hasil isolasi antibiotik dimurnikan dengan metode, diantaranya melalui filtrasi (penyaringan) dan sentrifugasi (Stanbury *et al.*, 1995).

### **2.2.2 Uji Aktivitas Antibiotika**

Untuk mengetahui suatu bahan atau cairan fermentasi mempunyai aktivitas antimikroba, maka perlu dilakukan uji aktivitas antibiotika. Uji aktivitas ini dapat dilakukan dengan beberapa metode mikrobiologi, antara lain melalui metoda difusi agar. Pada metode ini, media padat yang telah diinokulasi dengan mikroba uji disiapkan dalam cawan-cawan petri. Bahan atau cairan fermentasi yang akan diuji ditetaskan dalam cakram-cakram kertas atau dalam lubang-lubang pencadang dalam media uji. Setelah diinkubasi pada suhu dan waktu inkubasi tertentu, maka aktivitas antibiotik akan tampak sebagai suatu zona bening di sekitar cakram atau lubang pencadang (Madigan, 1997).



Gambar 2.4 Uji aktivitas antibiotika melalui metode difusi agar (Elliot, 1997)

### 2.3 Identifikasi Bakteri Penghasil Antibiotika

Identifikasi bakteri penghasil antibiotika dapat dilakukan berdasarkan pengamatan morfologi koloni, pengamatan mikroskopis menggunakan berbagai reaksi pewarnaan, uji-uji biokimia maupun menggunakan metode molekuler, antara lain melalui penentuan urutan 16S rDNA bakteri dengan metode *Polymerase Chain Reactions* (PCR)-sekuensing (Cappucino, 1987).

### **2.3.1 Pengamatan Morfologi Koloni**

Pengamatan morfologi koloni meliputi pengamatan terhadap bentuk dan warna koloni (Pelczar, 1986).

### **2.3.2 Pengamatan Mikroskopis**

Untuk memudahkan pengamatan mikroskopis, maka dilakukan berbagai prosedur pewarnaan terhadap sel bakteri yang telah difiksasi pada kaca obyek. Beberapa prosedur pewarnaan tersebut adalah :

#### **A. Pewarnaan Gram**

Pewarnaan Gram digunakan untuk mengetahui morfologi bakteri dan membedakan antara bakteri Gram positif dengan bakteri Gram negatif. Jika dilihat di bawah mikroskop, bakteri Gram positif akan berwarna ungu, karena dapat menahan kompleks pewarna primer karbol gentian violet-iodium sampai akhir prosedur pewarnaan. Bakteri Gram negatif akan berwarna merah, karena kehilangan kompleks warna karbol gentian violet-iodium dengan pembilasan alkohol, lalu terwarnai oleh pewarna tandingan air fuksin (Cappucino, 1987).

Perbedaan reaksi kedua golongan bakteri tersebut terhadap pewarnaan Gram disebabkan bakteri Gram positif memiliki dinding sel tebal yang akan menyusut pada saat pembilasan alkohol, sehingga pori-porinya menutup dan mencegah keluarnya kompleks pewarna primer pada saat pemucatan. Sedangkan dinding sel bakteri Gram negatif mengandung banyak lipid yang larut dalam alkohol pada saat pembilasan. Larutnya lipid memperbesar pori-pori dinding sel dan menyebabkan proses pemucatan berlangsung cepat (Cappucino, 1987).

**B. Pewarnaan Spora**

Pewarnaan spora digunakan untuk mengamati endospora bakteri. Endospora hanya terbentuk dalam lingkungan yang tidak menguntungkan, seperti kekurangan nutrisi. Bentuk ini tahan terhadap pemanasan dan unsur-unsur fisik lain, seperti pembekuan, kekeringan, radiasi ultraviolet serta bahan-bahan kimia yang dapat menghancurkan sel bakteri. Bila keadaan lingkungan kembali menjadi baik, maka dinding endospora akan pecah dan bakteri membentuk sel vegetatif kembali (Cappucino, 1987).

Endospora merupakan bentuk kehidupan yang paling resisten, sehingga mampu bertahan dalam debu dan tanah selama bertahun-tahun. Ketahanan endospora disebabkan adanya selubung spora yang keras dan tebal. Untuk dapat mewarnai endospora, diperlukan pemanasan agar pewarna dapat menembus selubung spora. Jika pewarna tersebut sudah memasuki endospora, maka pewarna tersebut akan sulit dihilangkan (Denyer, 2004).

**C. Pewarnaan Kapsul**

Pewarnaan kapsul digunakan untuk mengamati kapsul atau lendir bakteri. Beberapa jenis bakteri dan alga hijau-biru mengeluarkan bahan-bahan yang amat berlendir dan lengket untuk menyelubungi dinding sel. Bila bahan berlendir tersebut kompak dan memberikan bentuk tertentu (bundar atau lonjong), maka disebut kapsul. Tetapi bila bentuknya tidak teratur dan menempel kurang erat pada sel, maka disebut lapisan lendir. Kapsul bakteri sangat sukar diamati dengan mikroskop cahaya, karena tidak berwarna dan mempunyai indeks bias yang rendah. Selain itu, kapsul bakteri bersifat non-ionik, sehingga tidak dapat diwarnai dengan prosedur



pewarnaan sederhana. Untuk mengamati kapsul, digunakan gabungan prosedur pewarnaan negatif dengan pewarnaan sederhana (Cappucino, 1987).

### **2.3.3 Uji Biokimia**

Bakteri dapat diidentifikasi melalui berbagai uji biokimia, diantaranya berupa uji fermentasi karbohidrat, uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), uji motil, uji indol, uji sitrat, uji *Methyl Red* (MR) dan uji *Voges Proskauer* (VP).

#### **A. Uji Fermentasi Karbohidrat**

Uji fermentasi karbohidrat digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi karbohidrat tertentu dan menghasilkan asam serta gas. Dalam uji ini digunakan media pertumbuhan cair yang mengandung karbohidrat tertentu (glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, dan manitol) serta indikator fenol merah dalam tabung-tabung reaksi. Ke dalam tabung tersebut diletakkan tabung durham dalam posisi terbalik (Norman, 2005).

Pada proses fermentasi, karbohidrat akan diubah bakteri menjadi asam organik, seperti asam laktat, asam format, atau asam asetat. Suasana asam pada medium akan mengubah warna indikator fenol merah menjadi kuning tua. Pada beberapa bakteri, proses fermentasi ini juga menghasilkan asam dan gas (CO<sub>2</sub>). Gas yang dihasilkan akan terperangkap dalam tabung Durham, sehingga akan tampak gelembung dalam tabung tersebut (Cappucino, 1987).

**B. Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)**

Uji TSIA digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi glukosa, laktosa, dan sukrosa serta menghasilkan H<sub>2</sub>S. Media uji TSIA mengandung laktosa, sukrosa, glukosa, natrium tiosulfat, fero sulfat, dan indikator fenol merah (Cappucino, 1987).

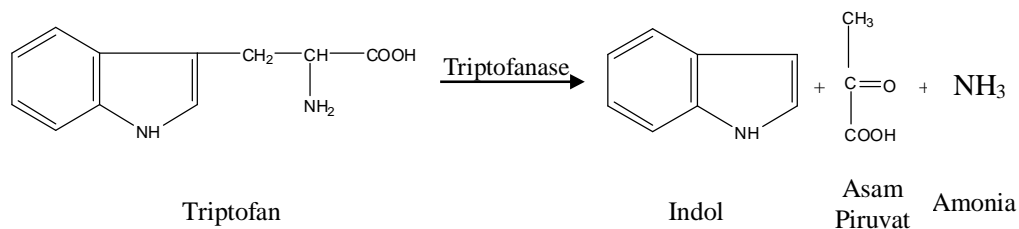
Jika bakteri uji dapat memfermentasi gula tertentu menjadi asam, maka media uji akan berubah warna menjadi kuning tua. Jika bakteri tersebut menghasilkan H<sub>2</sub>S, maka akan terdapat endapan berwarna hitam pada bagian bawah media uji. Endapan tersebut adalah fero sulfida yang berasal dari reaksi H<sub>2</sub>S dengan fero sulfat (Norman, 2005).

**C. Uji Motil**

Uji motil digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri untuk bergerak. Hasil uji positif, jika terdapat penyebaran pertumbuhan koloni bakteri di sekitar tempat inokulasi. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki alat gerak, misalnya flagel (Norman, 2005).

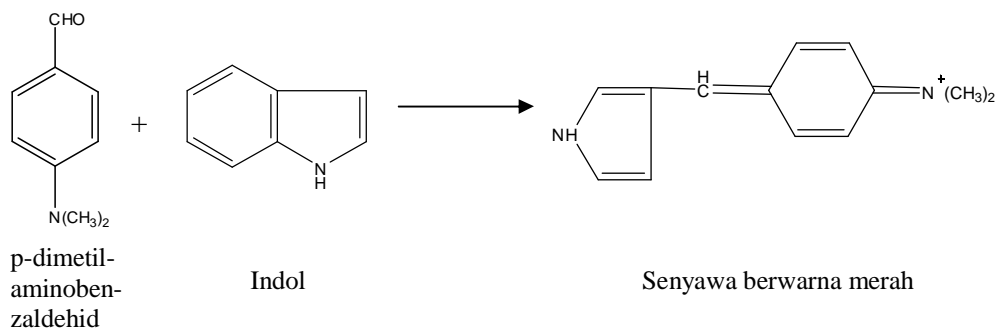
**D. Uji Indol**

Uji indol digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mendegradasi asam amino triptofan. Medium uji indol mengandung substrat triptofan, yaitu adalah asam amino esensial yang dapat teroksidasi oleh aktivitas enzimatik bakteri. Triptofan diubah menjadi produk metabolik indol, asam piruvat, dan amonia oleh enzim triptofanase (Cappucino, 1987).



Gambar 2.5 Reaksi oksidasi triptofan oleh enzim triptofanase (Cappucino, 1987).

Keberadaan indol dideteksi dengan penambahan pereaksi Kovac yang mengandung p-dimetilaminobenzaldehid, butanol, dan asam hidroklorat. Indol yang diekstraksi ke lapisan pereaksi tersebut akan mengasamkan komponen butanol dan membentuk kompleks dengan p-dimetilaminobenzaldehid yang menghasilkan warna merah (Cappucino, 1987).

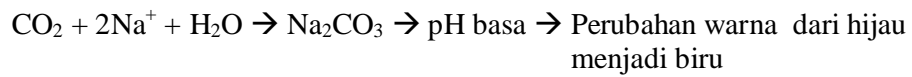
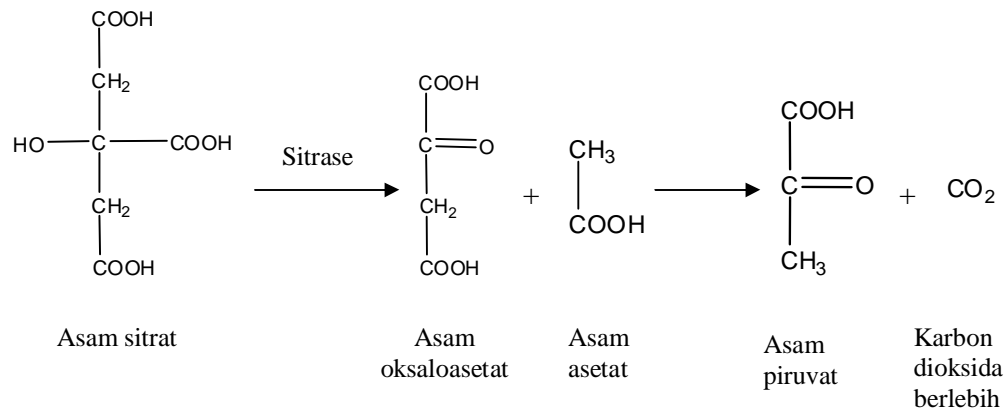


Gambar 2.6 Reaksi indol dengan komponen dalam pereaksi Kovac (Cappucino, 1987).

### E. Uji Sitrat

Uji sitrat digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi sitrat. Media *Simmons-Citrate* mengandung sitrat sebagai sumber karbon, garam amonium sebagai sumber nitrogen, dan indikator biru bromtimol yang berubah warna dari hijau menjadi biru dalam keadaan

basa. Sitrat diubah menjadi asam oksaloasetat dan asam asetat oleh enzim sitrase, lalu produk antara tersebut diubah menjadi asam piuvat dan karbondioksida secara enzimatik. Selama reaksi ini berlangsung, keadaan media *Simmons-Citrate* berubah menjadi basa, karena karbondioksida berikatan dengan natrium dan air membentuk natrium karbonat yang bersifat basa (Cappucino, 1987).

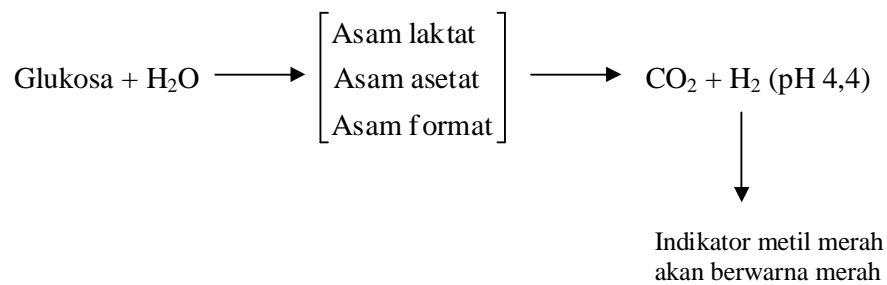


Gambar 2.7 Reaksi fermentasi sitrat secara enzimatik (Cappucino, 1987).

#### F. Uji Metil Red (MR)

Uji *metil red* dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi glukosa dan menghasilkan campuran asam. Adanya campuran asam dapat menurunkan derajat keasaman media sampai pH 5,0, yang terdeteksi dengan perubahan warna indikator metil merah dari kuning menjadi merah. Pada umumnya, bakteri yang memberikan hasil uji MR

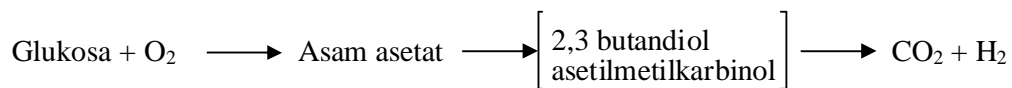
positif adalah bakteri penghasil gas, karena bakteri ini menghasilkan enzim format hidrogenliase yang memecahkan asam format menjadi karbon dioksida dan air (Cappucino, 1987).



Gambar 2.8 Reaksi fermentasi glukosa dalam media MR menjadi asam campuran (Cappucino, 1987).

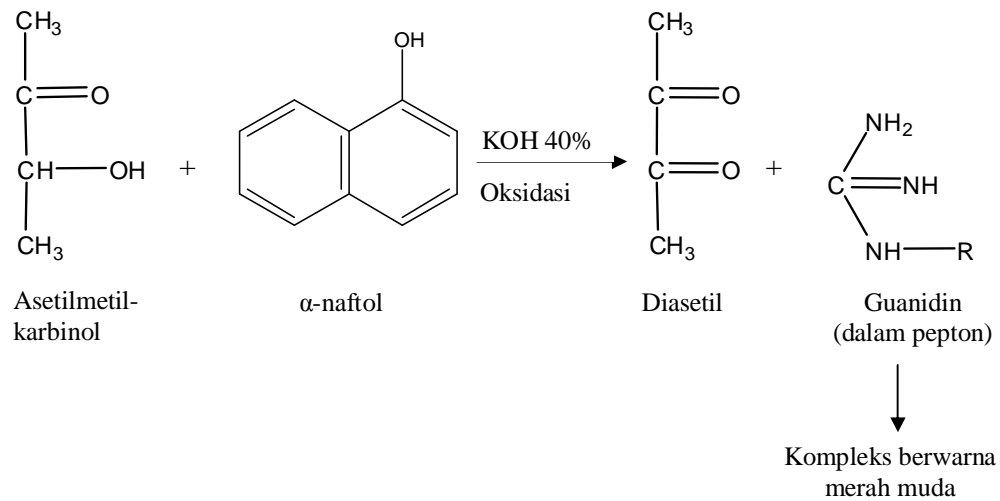
#### G. Uji *Voges Proskauer* (VP)

Uji *Voges Proskauer* digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi glukosa, namun tidak menghasilkan produk asam. Jika pada uji MR menunjukkan hasil negatif, maka bakteri tersebut tidak menghasilkan asam, melainkan 2,3-butandiol asetilmetilkarbinol.



Gambar 2.9 Reaksi fermentasi glukosa dalam medium VP menjadi senyawa non-asam (Cappucino, 1987).

Senyawa 2,3-butandiol dapat dideteksi menggunakan pereaksi Barrit yang mengandung  $\alpha$ -naftol dan kalium hidroksida 40%. Penambahan pereaksi ini mengakibatkan perubahan warna media VP menjadi merah muda atau merah, jika terdapat asetilmetilkarbinol (asetoin).



Gambar 2.10 Deteksi senyawa asetilmetilkarbinol menggunakan pereaksi Barritt (Cappucino, 1987).

Deteksi dilakukan terhadap asetilmetilkarbinol, karena senyawa ini hampir selalu terdapat bersama-sama 2,3-butandiol. Metode deteksi ini sering disebut metode tak langsung *Voges Proskauer* (Cappucino, 1987).

#### 2.3.4 Penentuan Urutan 16S rDNA dengan Metode PCR-sekuensing

Identifikasi bakteri dapat dilakukan melalui penentuan 16S rDNA (gen 16S rRNA) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)-sekuensing. Segmen 16S rDNA bakteri diamplifikasi melalui PCR, lalu urutannya ditentukan melalui sekuensing. Urutan basa dari 16S rDNA tersebut dibandingkan dengan berbagai urutan 16S rDNA dari berbagai organisme prokariot pada *gene bank*. Perbandingan urutan 16S rDNA juga merupakan cara untuk mengetahui filogenetik dan evolusi diantara berbagai organisme prokariot, karena gen ini

mengandung sejumlah besar urutan (sekuens) yang cenderung tetap (*highly conserved sequence patterns*) (Innis *et al.*, 1990)

Proses identifikasi bakteri melalui penentuan 16S rDNA dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)-sekuensing berlangsung melalui beberapa tahap, yaitu :

#### **A. Isolasi DNA Total**

DNA total adalah keseluruhan DNA yang terdapat dalam suatu sel.

Prosedur isolasi DNA total meliputi (Brown, 2006):

##### 1. Penyiapan biakan sel

Pada umumnya, suatu sel akan tumbuh lebih cepat pada medium cair, karena di dalamnya terdapat campuran nutrisi yang seimbang dan tepat untuk sel tumbuh dan membelah. Penyiapan biakan sel bakteri pada umumnya menggunakan medium cair Luria-Bertani (LB) atau M9.

##### 2. Preparasi ekstrak sel

Suatu sel bakteri dilindungi oleh dinding sel yang keras dan membran sitoplasma. Penghancuran kedua pelindung tersebut dapat dilakukan melalui cara fisika atau kimia. Cara kimia lebih sering digunakan, karena menghasilkan ekstrak sel yang lebih banyak dan lebih murni. Umumnya pelisisan sel secara kimia menggunakan enzim lisozim yang dapat menguraikan komponen polimer dinding sel serta etilen diamin tetra asetat (EDTA) yang dapat mengikat ion magnesium. Ion ini diperlukan dalam pembentukan struktur membran sitoplasma. Sel yang telah lisis disentrifugasi untuk memisahkan supernatan/ ekstrak sel yang mengandung DNA, RNA, dan protein dengan pelet sel.

### 3. Pemurnian DNA dari ekstrak sel

Untuk menghilangkan kontaminan protein, maka dilakukan deproteinasi ekstrak sel dengan penambahan fenol-kloroform (1:1). Namun, fenol pada konsentrasi berlebih dapat menyebabkan kerusakan terhadap DNA. Oleh karena itu, sebelumnya ditambahkan enzim protease yang mempermudah kerja fenol untuk mengendapkan protein. Beberapa molekul RNA juga mengendap dengan penambahan fenol, namun sebagian besar masih tertinggal pada supernatan. Cara yang paling efektif untuk menghilangkan RNA adalah dengan penambahan enzim ribonuklease (RNase).

### 4. Pemekatan DNA

Metode yang umum digunakan untuk memekatkan DNA adalah metode pengendapan etanol. Adanya penambahan garam (kation monovalen seperti  $\text{Na}^+$ ) pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  atau kurang, membuat etanol murni dapat mengendapkan DNA dengan sangat efisien. Molekul DNA akan berkumpul di bawah lapisan etanol dan dapat ditarik keluar menggunakan batang gelas. DNA juga dapat disentrifugasi dan melekat pada bagian bawah tabung sentrifugasi.

### 5. Penentuan konsentrasi DNA

Konsentrasi DNA dapat ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-sinar tampak pada panjang gelombang 260 nm. Jumlah radiasi yang diserap larutan (Absorban) berbanding lurus dengan konsentrasi DNA, yaitu  $A = 1$  sebanding dengan 50  $\mu\text{l}$  DNA untai ganda per ml.



Perbandingan (rasio) absorban pada panjang gelombang 260 dan 280 nm dapat menunjukkan kemurnian isolat DNA. Rasio kurang dari 1,8 menunjukkan adanya kontaminan protein dalam isolat DNA.

## **B. Amplifikasi DNA melalui PCR**

PCR merupakan suatu teknik sintesis asam nukleat secara *in vitro* yang mampu mengamplifikasi segmen DNA tertentu dari keseluruhan genom. Amplifikasi segmen DNA yang menjadi cetakan DNA melibatkan (Innis & Gelfand, 1990) :

### 1. Cetakan DNA

Cetakan DNA adalah DNA sampel yang mengandung segmen/sekuens DNA target untuk proses amplifikasi.

### 2. Primer

Primer adalah sepasang oligonukleotida berukuran 10-40 pasang basa (pb) yang komplementer terhadap sebagian sekuens DNA target. Kedua primer tersebut harus dirancang menggunakan *software* khusus berdasarkan sekuens DNA target.

Kriteria yang harus diperhatikan dalam perancangan primer adalah :

- a. Panjang masing-masing primer adalah 15-30 pb.
- b. Kandungan basa GC dalam primer minimal 50% atau lebih.
- c. Temperatur penempelan (*annealing*) dari kedua primer tidak boleh jauh berbeda.
- d. Urutan nukleotida yang sama harus dihindari, sehingga tidak menyebabkan terjadi *self dimer*, *pair dimer*, atau *hairpin*

### 3. *Taq* DNA Polimerase

Dalam proses PCR, terdapat tahap denaturasi DNA yang berlangsung pada suhu mendekati titik didih air. Oleh karena itu, proses amplifikasi DNA *in vitro* tersebut memerlukan enzim DNA polimerase yang stabil dalam suhu tinggi, antara lain adalah *Taq* DNA polimerase. Enzim yang diisolasi dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus* tersebut, digunakan untuk memperpanjang rantai DNA baru.

### 4. Dapar amplifikasi

Dapar dalam proses amplifikasi DNA *in vitro* digunakan mempertahankan pH larutan. Dapar ini umumnya mengandung  $MgCl_2$  yang berpengaruh terhadap stabilitas dan kerja DNA polimerase.

### 5. dNTP

dNTP atau deoksinukleotida trifosfat merupakan campuran keempat nukleotida (dATP, dGTP, dCTP dan dTTP) yang berperan sebagai monomer untuk pembentukan untai DNA baru.

Proses amplifikasi berlangsung dalam beberapa siklus berulang, dimana setiap siklus terdiri dari tahap denaturasi cetakan DNA, penempelan primer pada rangkaian komplemennya (*annealing*), dan pemanjangan rantai DNA baru (*extension*) (Brown, 1995) yaitu :

#### 1. Denaturasi

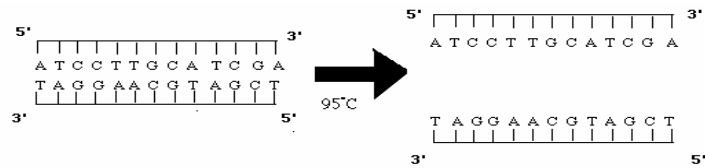
Pada tahap ini, cetakan DNA (*DNA template*) dipanaskan sampai suhu  $94^{\circ}C$ , sehingga pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal. Kedua untai tunggal tersebut menjadi cetakan bagi untai DNA yang baru.

## 2. Penempelan (*Annealing*)

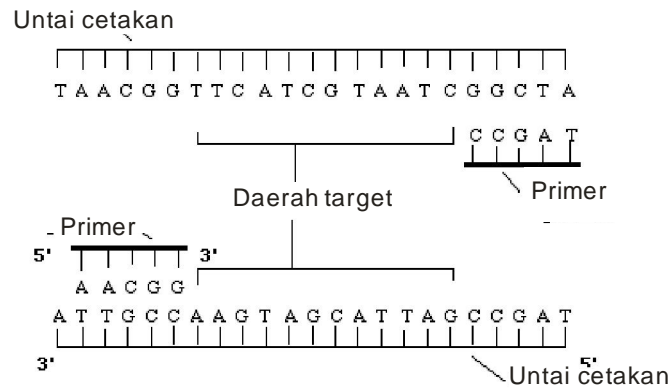
Pada tahap ini, terjadi penempelan penempelan kedua primer pada rangkaian komplemen di kedua untai DNA untai tunggal. Primer diperlukan, karena enzim DNA *Taq* polimerase hanya dapat memperpanjang rantai DNA baru. Penempelan primer memerlukan suhu sekitar  $T_m$  (*melting temperature*) kedua primer, umumnya sekitar  $55^{\circ}\text{C}$  selama 30-60 detik.

## 3. Pemanjangan (*Extension*)

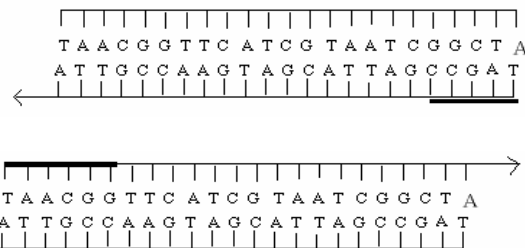
Setelah primer menempel pada untai cetakan DNA, maka enzim DNA *Taq* polimerase dapat memanjangkan primer dan membentuk untai DNA baru. Pembentukan DNA untai ganda baru berlangsung secara semi konservatif, artinya DNA untai ganda baru mengandung satu untai lama dan satu untai baru.



(a)



(b)

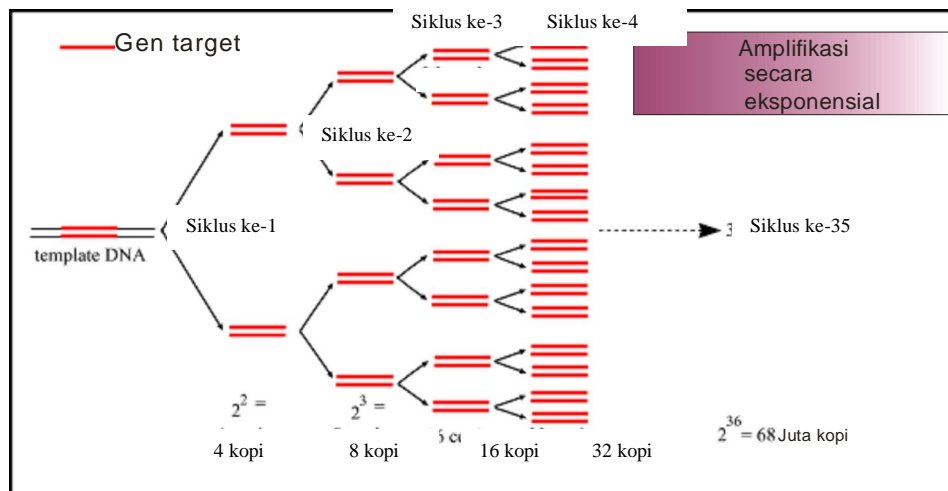


(c)

Gambar 2.11 Tahap-tahap amplifikasi DNA melalui metode *Polymerase Chains Reactions* (PCR) (Innis *et al.*, 1990)

- Keterangan:
- Tahap denaturasi cetakan DNA untai ganda menjadi untai tunggal
  - Tahap penempelan kedua primer pada untai komplement di kedua untai cetakan DNA
  - Tahap pemanjangan rantai DNA baru oleh enzim DNA *Taq* polimerase

Ketiga tahap tersebut berlangsung secara berulang yang menghasilkan molekul DNA baru secara eksponensial (Innis *et al.*, 2001).



Gambar 2.12 Proses pembentukan DNA baru secara eksponensial (Innis *et al.*, 1990)

### C. Pemisahan Molekul DNA Menggunakan Elektroforesis Gel

Molekul DNA mempunyai muatan listrik negatif, sehingga bila ditempatkan pada medan listrik dalam proses elektroforesis akan bermigrasi menuju kutub positif. Tetapi fragmen-fragmen DNA dengan ukuran yang berbeda tidak dapat dipisahkan melalui elektroforesis biasa (Innis, 2001).

Ukuran molekul DNA dapat menjadi faktor pemisahan, jika elektroforesis dilakukan menggunakan medium gel. Gel tersebut dapat dibuat dari agarosa, poliakrilamida atau campuran keduanya. Dalam gel terdapat pori-pori kompleks yang harus dilewati molekul DNA menuju elektroda positif. Makin kecil ukuran molekul DNA, makin cepat migrasinya,

sehingga molekul-molekul DNA akan terpisah berdasarkan ukurannya (Innis, 2001).

Gel dapat dibuat dalam berbagai bentuk, ukuran, porositas serta dijalankan dalam berbagai konfigurasi. Kemampuan pemisahan gel agarosa lebih rendah dibanding gel poliakrilamida. DNA berukuran 2 pb sampai 50 kilo basa (kb) dapat dipisahkan dalam berbagai konsentrasi gel agarosa. Kondisi elektroforesis yang biasa digunakan adalah pada arus 30-70 miliAmpere, tegangan 100 volt selama kurang lebih 50 menit (Innis, 2001).

#### **D. Penampakan DNA dalam Gel**

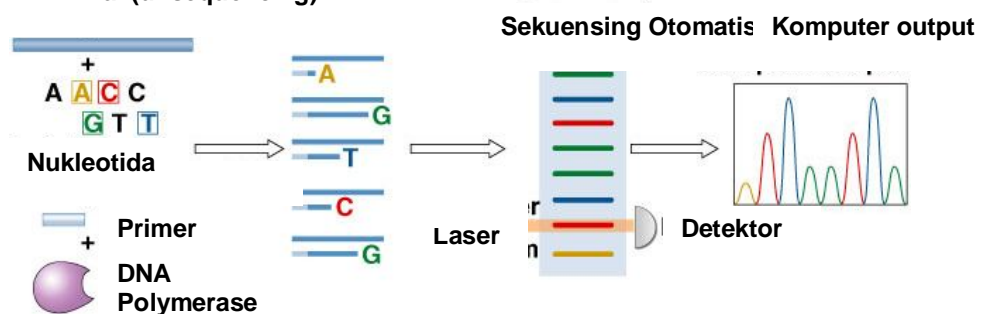
Letak DNA pada gel dapat dilihat dengan merendam gel dalam larutan etidium bromida 1%. Zat ini dapat terinterkalasi di antara untai ganda DNA dan membuat molekul DNA menjadi lebih kaku. Reaksi ini menyebabkan fluoresensi pita-pita DNA di bawah cahaya UV pada panjang gelombang 300-360nm. Untuk menjaga agar pita DNA tidak melebihi batas gel, maka ditambahkan dapar *loading*.. Dapar berwarna biru ini akan bergerak lebih cepat dibandingkan pita DNA (Brown, 2006).

#### **E. Penentuan Urutan (Sekuensing) DNA Melalui Metode Dideoxynucleotide Chain- Termination Sanger**

Penentuan urutan (sekuensing) DNA merupakan proses penentuan urutan basa suatu segmen DNA. Metode sekuensing yang paling banyak digunakan adalah metode dideoksi Sanger. Metode ini mirip dengan amplifikasi DNA melalui PCR, yaitu menggunakan enzim DNA polimerase dan monomer-monomer dNTP untuk memperpanjang primer

sepanjang untai, yang dilakukan melalui siklus suhu yang berulang. Bedanya, proses sekuensing dapat menggunakan DNA untai tunggal maupun untai ganda dan hanya memerlukan satu primer (Milanda, 2001). Pada reaksi sekuensing, perpanjangan untai DNA diterminasi secara acak dengan adanya analog dNTP, yaitu dideoksinukleotida trifosfat (ddNTP). Proses ini menghasilkan fragmen-fragmen DNA dengan selisih satu nukleotida saja. Fragmen-fragmen tersebut dipisahkan melalui elektroforesis gel poliakrilamida beresolusi tinggi. Deteksi produk sekuensing dilakukan dengan cara pelabelan radioaktif atau non radiaktif (menggunakan pelabel fluoresen). Pelabelan dapat dilakukan terhadap primer maupun komponen ddNTP. Pelabelan fluoresen pada ddNTP (*dye terminator labeling*) memberikan kemudahan, karena memungkinkan pemisahan fragmen hasil sekuensing berlangsung pada satu sumur gel saja. Hal itu disebabkan setiap nukleotida terakhir akan memberikan warna yang berbeda (Milanda, 2001).

#### DNA Awal (unsequencing)



Gambar 2.13 Sekuensing suatu fragmen DNA menggunakan metode *dye terminator labeling* (Brown, 2006)

## **BAB III**

### **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **3.1 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi isolat bakteri penghasil zat antibakteri dari cairan kantung tanaman kantong semar dari spesies *N. ampullaria*, yang memiliki aktivitas terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif, yang diwakili oleh *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*.

#### **3.2 Manfaat Penelitian**

Dari penelitian ini diharapkan diperoleh informasi adanya bakteri penghasil antibakteri dalam cairan kantung tanaman kantong semar (*N. ampullaria*) yang memiliki aktivitas terhadap *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*.



## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Bahan**

##### **4.1.1 Bahan Uji dan Bakteri Uji**

Bahan uji yang digunakan adalah cairan dari kantung tanaman kantong semar (*Nepenthes ampullaria*). Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* dari sampel klinik PT. Bio Farma Bandung.

##### **4.1.2 Bahan Kimia**

Agar nutrisi (Pronadisa), kaldu nutrisi (Oxoid), air suling, asam klorida 0,1 N (Merck), medium indol (Merck), indikator metil merah (Merck), *α-naftol* (Merck), alkohol 95% (Bratachem), kalium hidroksida/KOH (Merck), medium fermentasi gula (glukosa, laktosa, manitol, maltosa, atau sukrosa. ditambahkan indikator fenol merah dan dimasukkan tabung Durham dengan posisi terbalik (Merck), medium MR-VP (Merck), agar *Simmon Citrate* (pepton, agar,  $\text{KH}_2\text{SO}_4$  dan sitrat/Merck), tripton (Merck), natrium klorida/NaCl (Merck), ekstrak ragi (Oxoid), etil diamin tetra asetat/EDTA (Bratachem), lisozim (Merck), larutan dapar A dan dapar B (Merck), kloroform, etanol p.a, dapar TE (Tris-EDTA, 1:3), RNase (Merck), ddH<sub>2</sub>O, primer 1 (primer *forward*, 5'GGTTAC(G/C)TTGTTACGACTT 3') dan primer 2 (primer *reverse*, 5'AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG 3'), dapar amplifikasi 10X (Amersham), magnesium klorida/MgCl<sub>2</sub> (Merck), dNTP (Amersham), *Taq* DNA polimerase

(Amersham), agarosa (Bohringer Mannheim), dapar TAE (Merck), etidium bromida (Merck), GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham), medium Luria Bertani (tripton 10 g, NaCl 5 g, ekstrak ragi 5 g per liter), metil merah (Merck), pereaksi *Barrit* ( $\alpha$ -naftol:KOH, 1:3/Merck), tinta cina (GM), brom timol biru (Merck), minyak emersi (Merck), media motil dan indol (Oxoid), NaOH (Merck), pewarna gentian violet (Merck), karbol fuksin (Merck) dan lugol (Merck).

#### **4.2 Alat**

Spatula, timbangan analitik (Mettler-Toledo), oven (Memmert), otoklaf (Shanghai), ose, mikropipet 100-1000  $\mu$ L dan 1-10  $\mu$ L (Socorex), alat sentrifugasi (Hettick), tabung Eppendorf 1,5 mL, cawan petri diameter 20 dan 5 cm (Normax), perforator diameter 10 mm, pemanas (Toyomi), vorteks (Genie), tabung sentrifuga 15 mL dan 200  $\mu$ L, pengocok orbital (Jenke & Kunke), mikrosentrifugator (Eppendorf), *Thermocycler*/alat PCR (Perkin Elmer), alat elektroforesis, mini transiluminator (Bio-Rad), kolom GFX (Eppendorf), pinset, bunsen, inkubator, lemari es, *plastic wrap*, aluminum foil, perforator diameter 10 mm, mikroskop (Olympus) dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium mikrobiologi.

### **4.3 Metode Penelitian**

#### **4.3.1 Isolasi dan Pemurnian Bakteri dari Cairan Kantung Tumbuhan Kantong Semar**

Sebanyak 10 mL cairan dari kantung tanaman kantong semar diambil secara aseptis, lalu disuspensikan dalam 10 mL kaldu nutrien dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu kamar. Satu ose suspensi ditanamkan pada agar nutrien pH 5,0 (20 mL) dalam cawan petri, lalu diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu kamar.

Masing-masing koloni bakteri yang tumbuh ditanamkan kembali dalam agar nutrien baru. Biakan-biakan tersebut diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu kamar.

#### **4.3.2 Fermentasi Isolat Bakteri**

Biakan murni dari setiap isolat bakteri disuspensikan dalam air suling steril di tabung-tabung reaksi dengan bantuan vorteks. Kekeruhan biakan diatur agar sama dengan kekeruhan tabung *Mc Farland* No. III, yang sebanding dengan  $10^3$  sel bakteri/mL.

Sebanyak 1 mL masing-masing suspensi (10 %) ditambahkan pada 19 mL kaldu nutrien dalam labu Erlenmeyer 50 mL. Seluruh biakan dikocok di atas pengocok orbital dengan kecepatan 200 rpm selama 48 jam pada suhu kamar. Cairan hasil fermentasi dimasukkan ke tabung-tabung Eppendorf 1,5 mL, lalu disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm. Supernatannya dipindahkan ke tabung baru, sedangkan endapan sel bakteri dibuang.

#### **4.3.3 Penyiapan Bakteri Uji**

Biakan murni dari kedua bakteri uji (*Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*) disuspensikan dalam air suling steril di tabung reaksi dengan bantuan vorteks. Kekeruhan biakan diatur agar sama dengan kekeruhan tabung *Mc Farland* No. III.

#### **4.3.4 Pengujian Aktivitas Antibakteri Supernatan Hasil Fermentasi terhadap Bakteri Uji**

Masing-masing 0,2 mL suspensi bakteri *E. coli* dan *B. subtilis* (1 %) ditambahkan ke 20 mL agar nutrien cair dalam cawan petri, dihomogenkan, lalu dibiarkan membeku pada suhu kamar. Setelah membeku, agar tersebut dilubangi menggunakan perforator. Sebanyak 50  $\mu$ L supernatan dimasukkan ke dalam masing-masing lubang pencadang menggunakan mikropipet, lalu diinkubasikan selama 18-24 jam dalam inkubator bersuhu 37-38<sup>0</sup>C. Zone hambat (bening) yang terjadi di sekitar lubang pencadang diamati dan diukur.

#### **4.3.5 Identifikasi Isolat Bakteri Penghasil Senyawa Antibakteri**

##### **A. Pengamatan Morfologi Koloni**

Pengamatan dilakukan terhadap warna, bentuk, tepian dan elevasi koloni bakteri.

##### **B. Pengamatan Mikroskopik Sel Bakteri**

###### **1. Pewarnaan Gram**

Sebanyak satu ose isolat bakteri disuspensikan dalam air suling steril, lalu difiksasi di atas kaca objek yang bersih. Olesan bakteri digenangi dengan dua tetes karbol gentian violet, lalu dibiarkan satu

menit. Zat warna yang berlebih dibuang, lalu kaca obyek dibilas dengan air mengalir. Olesan bakteri digenangi dengan dua tetes larutan lugol 2 %, lalu dibiarkan satu menit. Lugol yang berlebih dibuang, lalu olesan dipucatkan menggunakan alkohol 95%. Setelah dibilas dengan air mengalir, olesan digenangi 2-3 tetes air fukhsin 1%, lalu dibiarkan satu menit. Zat warna berlebih dibuang, lalu dibilas dengan air dan dikeringkan menggunakan kertas saring. Olesan tersebut ditetesi minyak emersi, lalu diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1.000 kali. Bakteri Gram negatif akan berwarna merah, sedang Gram positif akan berwarna ungu.

## **2. Pewarnaan Spora**

Koloni bakteri disuspensikan dalam NaCl fisiologis steril dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan karbol fuksin (1:1). Campuran tersebut dipanaskan dalam penangas air bersuhu 80°C selama 10 menit. Campuran dioleskan di atas kaca obyek yang bersih, lalu digenangi dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% selama dua detik. Setelah dicuci dengan air suling, olesan tersebut digenangi dengan pewarna biru metilen selama lima menit. Zat warna yang berlebih dibuang, lalu dibilas dengan air dan dikeringkan menggunakan kertas saring. Olesan tersebut ditetesi minyak emersi, lalu diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Endospora akan berwarna merah dan badan vegetatif akan berwarna biru.

### **3. Pewarnaan Kapsul**

Koloni bakteri disuspensikan dalam NaCl fisiologis steril. Satu ose suspensi bakteri dan satu tetes tinta cina diletakkan di ujung kanan kaca obyek. Keduanya dicampurkan dengan menggunakan sudut kaca obyek lain hingga homogen. Kaca obyek kedua diletakkan pada ujung kanan kaca obyek pertama dengan sudut  $45^\circ$ , lalu diseret sepanjang kaca obyek pertama. Preparat difiksasi dengan melalukannya di atas api sebanyak tiga kali, lalu dgenangi dengan pewarna air fuksin selama lima menit. Zat warna yang berlebih dibuang, lalu dikeringkan dengan kertas saring. Preparat tersebut ditetesi minyak emersi lalu diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 1.000 kali. Kapsul akan tampak sebagai bagian bening di sekitar tubuh bakteri, sedangkan sel bakteri akan berwarna merah.

## **C. Identifikasi Berdasarkan Uji Biokimia**

### **1. Uji Fermentasi Karbohidrat**

Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam tabung-tabung reaksi yang berisi medium fermentasi glukosa, laktosa, manitol, maltosa, dan sukrosa, lalu diinkubasikan dalam suhu kamar selama 18-24 jam. Uji fermentasi karbohidrat positif, jika warna merah medium fermentasi karbohidrat berubah menjadi kuning, berarti bakteri tersebut memfermentasi gula dan menghasilkan asam. Bila dalam tabung durham terdapat gelembung, berarti fermentasi tersebut juga menghasilkan gas ( $\text{CO}_2$ ).

## **2. Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)**

Sebanyak satu ose bakteri digoreskan secara zig-zag, kemudian ditusukkan pada media uji agar miring TSIA, lalu diinkubasikan pada suhu kamar selama 18-24 jam. Uji TSIA menunjukkan hasil positif, jika terjadi perubahan warna indikator merah fenol dalam medium uji menjadi kuning tua. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri uji tersebut memfermentasi gula dalam media TSIA menjadi asam. Jika medium agar pecah atau terangkat, maka dalam proses fermentasi tersebut dihasilkan gas. Jika pada bagian bawah medium berwarna hitam, maka dalam proses fermentasi tersebut dihasilkan  $H_2S$ .

## **3. Uji *Motilitas***

Sebanyak satu ose isolat bakteri ditusukkan dalam medium uji motilitas yang berupa agar semi solid, lalu diinkubasikan dalam suhu kamar selama 18-24 jam. Uji motilitas positif ditandai adanya penyebaran koloni di sekitar tusukan.

## **4. Uji *Indol***

Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam tabung reaksi berisi medium uji indol, lalu diinkubasikan dalam suhu kamar selama 18-24 jam. Uji indol positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin merah di permukaan medium dengan penambahan tiga tetes pereaksi *Kovac*.

### 5. Uji Sitrat

Sebanyak satu ose isolat bakteri digores zig-zag pada permukaan agar miring *Simmons-citrate*, lalu diinkubasikan dalam suhu kamar selama 18-24 jam. Uji sitrat positif ditunjukkan dengan perubahan warna medium tersebut dari hijau menjadi biru.

### 6. Uji Metil Red (MR)

Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasi dalam medium MR-VP, lalu diinkubasikan dalam suhu kamar selama 18-24 jam. Uji MR positif dengan terbentuknya warna merah dengan tiga sampai empat tetes indikator merah metil.

### 7. Uji Voges – Proskauer ( VP )

Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasi dalam medium MR-VP, lalu diinkubasikan dalam suhu kamar selama 18-24 jam. Reaksi VP positif dengan adanya pembentukan asam yang ditandai berubahnya warna medium menjadi merah muda setelah penambahan dua mL pereaksi *Barrit*.

## D. Identifikasi Salah Satu Bakteri Penghasil Antibakteri Melalui Penentuan Urutan 16S rDNA

### 1. Isolasi DNA Total

Isolat bakteri diinokulasikan dalam 100 mL medium cair Luria-Bertani di Erlenmeyer 250 mL, lalu dikocok di atas pengocok orbital pada kecepatan 2.000 selama 24 jam dalam suhu kamar. Biakan bakteri dipanen dengan cara disentrifugasi, lalu supernatannya dibuang.



Pelet sel disuspensikan dalam 480  $\mu\text{L}$  larutan EDTA 5 %, lalu ditambahkan 120  $\mu\text{L}$  lisozim. Setelah diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30-60 menit, suspensi sel disentrifugasi pada kecepatan 8.000 selama 30 menit dalam suhu ruang. Supernatan dibuang, lalu endapannya disuspensikan dalam 350  $\mu\text{L}$  larutan dapar A dengan bantuan vorteks.

Suspensi tersebut diinkubasi dalam penangas air bersuhu  $65^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Ke dalam suspensi ditambahkan 150  $\mu\text{L}$  larutan dapar B dan 500  $\mu\text{L}$  kloroform, lalu divorteks. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang.

Supernatan dipindahkan ke tabung Eppendorf 1,5 mL yang baru, ditambahkan 1 mL etanol p.a yang telah didinginkan, lalu diinkubasi dalam penangas es selama 30 menit. Setelah disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang, bagian supernatan dibuang. Tabung dibalik dan ditiriskan diatas tissue. Ke dalam endapan ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  etanol 70% yang telah didinginkan, lalu diinkubasi dalam penangas es selama 30 menit. Untuk menghilangkan RNA, ditambahkan 2  $\mu\text{L}$  RNase (40  $\mu\text{L}/\text{ml}$ ) lalu diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit). Setelah disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang, bagian supernatan dibuang. Endapan dalam tabung dikeringkan dalam oven vakum bersuhu  $50^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. Pelet DNA disuspensikan kembali dalam 100  $\mu\text{L}$  dapat TE.

Untuk mendapatkan gel agarosa 1 %, sebanyak 0,24 gram agarosa dilarutkan dalam 30 ml dapar elektroforesis TAE 0,5 X dengan cara dididihkan.. Setelah agak dingin, larutan ditambahkan 2  $\mu\text{L}$  larutan etidium bromida 10 mg/mL, lalu dituangkan ke dalam cetakan agar.

Plat agarosa dimasukkan ke dalam alat elektroforesis, lalu ditambahkan dapar elektroforesis TAE 0,5 X hingga terendam seluruhnya. Sebanyak 3  $\mu\text{l}$  DNA sampel, masing-masing ditambahkan 7  $\mu\text{l}$  ddDH<sub>2</sub>O dan 2  $\mu\text{L}$  dapar *loading*, lalu dimasukkan dalam sumur-sumur gel. Alat elektroforesis diberi arus 100 volt selama 30 menit. Pita DNA dalam gel diamati di atas mini transiluminator.

## 2. Amplifikasi Gen 16S rDNA melalui PCR

Campuran reaksi PCR dibuat dengan mencampurkan 26,6  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, masing-masing 2  $\mu\text{L}$  primer 1 dan 2 20 pmol, 5  $\mu\text{l}$  dapar *Taq*, 3  $\mu\text{L}$  MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1  $\mu\text{L}$  dNTP 20mM, 0,4  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA polimerase 50 mM, dan 10  $\mu\text{L}$  DNA sampel dalam tabung Eppendorf 1,5 mL. Tabung dimasukkan ke dalam *thermocycler*, lalu diset suhu dan waktu amplifikasi, yaitu pre PCR (denaturasi awal) 94<sup>0</sup>C selama 5 menit, 30 siklus PCR dengan tahap denaturasi 94<sup>0</sup>C selama 1 menit, *annealing* 48<sup>0</sup>C selama 1 menit, dan pemanjangan fragmen DNA 72<sup>0</sup>C selama 2 menit, lalu diakhiri *post* PCR 72<sup>0</sup>C selama 10 menit.

Gel agarosa dengan konsentrasi 1% disiapkan, lalu dimasukkan ke dalam alat elektroforesis. Sebanyak 2  $\mu\text{L}$  hasil PCR dan DNA marka (1 kb) masing-masing ditambahkan 10  $\mu\text{L}$  dapar *loading*, lalu

dilakukan elektroforesis selama 30 menit. Hasil elektroforesis diamati di atas mini transiluminator pada panjang gelombang 260 nm.

### **3. Pemurnian Fragmen 16S rDNA**

Pita fragmen 16S rDNA dipotong dari gel, lalu dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 mL. Setiap 10 mg gel, ditambahkan 10 ml dapar *capture*, lalu diinkubasi pada suhu 65<sup>0</sup>C selama 15 menit. Campuran dimasukkan ke dalam kolom GFX yang sudah dipasang pada *collecting tube*, lalu disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Cairan pada DNA yang menempel *collecting tube* dibuang, sedangkan kolom GFX dipindahkan ke *collecting tube* baru. Ke dalam kolom GFX tersebut, ditambahkan 500 µL dapar pencuci, lalu disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Cairan pada *collecting tube* dibuang kembali, sedangkan kolom GFX dimasukkan ke *collecting tube* yang baru. Ke dalam kolom GFX tersebut ditambahkan 25 µL ddH<sub>2</sub>O, lalu didiamkan selama 1 menit. Tabung disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Kemurnian fragmen 16S rDNA dicek melalui elektroforesis menggunakan gel agarosa 1 %.

### **4. Penentuan Urutan (Sekuensing) Fragmen 16S rDNA**

Penentuan urutan 16S rDNA dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Gedung 630, Badan Pusat Pengkajian Teknologi (BPPT). Analisis hasil dilakukan dengan memBLAST urutan nukleotida dari hasil

sekuensing 16S rDNA dengan *data base* yang tersedia pada situs

[www.ncbi.nlm.nih](http://www.ncbi.nlm.nih)

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1 Hasil Isolasi dan Pemurnian Bakteri dari Cairan Kantung Tumbuhan Kantong Semar

Proses isolasi dan pemurnian bakteri dari cairan kantung tumbuhan kantong semar menghasilkan 3 koloni bakteri dengan warna koloni dan waktu inkubasi yang berbeda, yaitu:

1. Koloni bakteri berwarna putih, waktu inkubasi 24 jam.
2. Koloni bakteri berwarna kuning, waktu inkubasi 48 jam.
3. Koloni bakteri berwarna ungu, waktu inkubasi 48 jam.

Hasil isolasi dan pemurnian bakteri dari cairan kantung tumbuhan kantong semar dapat dilihat pada Gambar 4.1-4.2 Lampiran 1.

#### 5.2 Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Supernatan Hasil Fermentasi terhadap Bakteri Uji

Hasil pengujian aktivitas antibakteri supernatan hasil fermentasi isolat bakteri terhadap bakteri uji dapat dilihat pada Tabel 5.1 serta Gambar 5.3-5.4 Lampiran 2.

Tabel 5.1 Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Supernatan Hasil Fermentasi terhadap Bakteri Uji

Warna koloni isolat bakteri	Diameter hambatan (mm) supernatan hasil fermentasi terhadap bakteri uji	
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
putih	19,90	19,50
ungu	21,40	22,25

kuning	-	20,00
--------	---	-------

Pada Tabel 5.1 dapat terlihat bahwa bakteri dengan koloni berwarna putih dan kuning mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*, dengan aktivitas terbesar dihasilkan oleh bakteri koloni ungu. Ketiga bakteri mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis*, dengan aktivitas terbesar dihasilkan oleh bakteri koloni ungu. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri terbesar terhadap kedua bakteri uji dihasilkan oleh bakteri koloni berwarna ungu.

### 5.3 Hasil Identifikasi Isolat Bakteri Penghasil Antibakteri

#### 5.3.1 Hasil Pengamatan Morfologi Koloni

Hasil identifikasi isolat bakteri penghasil antibakteri berdasarkan pengamatan morfologi koloni dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Isolat Bakteri Penghasil Antibakteri

Karakteristik morfologi koloni			
Warna	Bentuk	Tepian	Elevasi
Putih susu	Tak beraturan	Tak beraturan	Datar
Ungu	Bundar	Licin	Timbul
Kuning	Bundar	Licin	Timbul

Pada Tabel 5.2 diketahui bahwa ketiga koloni bakteri memiliki karakteristik koloni yang khas. Bakteri berwarna putih memiliki bentuk koloni tak beraturan, dengan tepian tak beraturan dan elevasi datar. Bakteri berwarna ungu dan kuning memiliki karakteristik yang sama, yaitu bentuk koloni bundar, tepian licin serta elevasi timbul.

### 5.3.2 Hasil Pengamatan Mikroskopik

Hasil identifikasi isolat bakteri penghasil antibakteri berdasarkan pengamatan mikroskopik dapat dilihat pada Tabel 5.3. dan Gambar 5.5-5.13 Lampiran 3.

Tabel 5.3 Hasil Pengamatan Mikroskopik Isolat Bakteri Penghasil Antibakteri

Warna koloni	Hasil pengamatan mikroskopik menggunakan pewarnaan		
	Gram	Spora	Kapsul
Putih susu	Batang, positif	Positif	Positif
Ungu	Batang, positif	Positif	Positif
Kuning	Batang, positif	Negatif	Negatif

Dari Tabel 5.3 diketahui bakteri putih dan ungu berbentuk batang Gram positif, berkapsul dan membentuk spora, sedangkan bakteri kuning berbentuk batang Gram positif, tidak berkapsul dan tidak membentuk spora. Ketiga bakteri mempunyai dinding sel yang tebal, sehingga pori-porinya menyusut pada saat pembilasan dengan alkohol dan mencegah larutnya kompleks pewarna primer gentian violet-lugol, sehingga sel bakteri berwarna ungu pada pewarnaan Gram. Bakteri putih dan ungu membentuk endospora yang terletak sentral, yang tampak merah pada pewarnaan spora. Kedua bakteri itu juga mempunyai kapsul di sekitar badan bakteri, yang tampak lonjong dan bening pada pewarnaan kapsul.

### 5.3.3 Hasil Identifikasi Berdasarkan Uji Biokimia

Hasil identifikasi isolat bakteri berdasarkan uji biokimia dapat dilihat pada Tabel 5.4 dan Gambar 5.14 – 5.16 Lampiran 4.

Tabel 5.4 Hasil Uji Biokimia dari Isolat Bakteri

Jenis uji biokimia	Koloni bakteri		
	Putih	ungu	kuning
Fermentasi karbohidrat :			
- glukosa	+/g(-)	+/- g()	-
- laktosa	-	-	-
- sukrosa	-	-	-
- maltosa	-	-	-
- manitol	-	-	-
TSIA	+ / H <sub>2</sub> S(+)	+ / H <sub>2</sub> S(+)	+ / - / H <sub>2</sub> S(+)
Motilitas	+	-	-
Indol	-	+	-
Sitrat	-	-	+
MR	+	+	-
VP	-	-	-

Keterangan:

(+/-) : perubahan warna dari merah menjadi oranye.

(g) : gas

Berdasarkan Tabel 5.4 dan Gambar 5.14 Lampiran 4, bakteri putih hanya memfermentasi glukosa dan menghasilkan asam, tetapi proses fermentasi tersebut tidak menghasilkan gas. Uji TSIA memberikan hasil positif, berarti bakteri putih memfermentasi gula dalam medium TSIA dan menghasilkan hidrogen sulfida. Bakteri tersebut mampu bergerak, sehingga diperkirakan mempunyai flagel. Pergerakan bakteri pada media motil mengarah ke permukaan, maka disimpulkan termasuk bakteri aerob. Uji indol memberikan hasil negatif, berarti bakteri tersebut tidak memproduksi triptofanase. Uji sitrat memberikan hasil negatif, berarti bakteri ini tidak mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya. Uji MR memberikan hasil positif, berarti bakteri ini mampu memfermentasikan



glukosa dan menghasilkan campuran asam. Uji VP menghasilkan reaksi negatif, dikarenakan bakteri tidak menghasilkan 2,3 butandiol dan etanol.

Berdasarkan Tabel 5.4 dan Gambar 5.15 Lampiran 4, bakteri ungu hanya memfermentasi glukosa dan menghasilkan asam, tetapi proses fermentasi tersebut tidak menghasilkan gas. Uji TSIA memberikan hasil positif, berarti bakteri ungu memfermentasi gula dalam medium TSIA dan menghasilkan hidrogen sulfida. Bakteri tersebut tidak mampu bergerak. Uji indol memberikan hasil positif, berarti bakteri tersebut memproduksi triptofanase. Uji sitrat memberikan hasil negatif, berarti bakteri ini tidak mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya. Uji MR memberikan hasil positif, berarti bakteri ini mampu memfermentasikan glukosa dan menghasilkan campuran asam. Uji VP menghasilkan reaksi negatif, dikarenakan bakteri tidak menghasilkan 2,3 butandiol dan etanol.

Berdasarkan Tabel 5.4 dan Gambar 5.16 Lampiran 4, bakteri kuning tidak mampu memfermentasi gula-gula dalam medium uji. Uji TSIA memberikan hasil positif, berarti bakteri ungu memfermentasi gula dalam medium TSIA dan menghasilkan hidrogen sulfida. Bakteri tersebut tidak mampu bergerak. Uji indol memberikan hasil negatif, berarti bakteri tersebut tidak memproduksi triptofanase. Uji sitrat memberikan hasil positif, berarti bakteri ini mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya. Uji MR memberikan hasil negatif, berarti bakteri ini mampu memfermentasikan glukosa dan menghasilkan campuran asam. Uji VP menghasilkan reaksi negatif, dikarenakan bakteri tidak menghasilkan 2,3 butandiol dan etanol.

Identifikasi bakteri dilakukan dengan cara membandingkan hasil pengamatan morfologi koloni, pengamatan mikroskopis dan uji biokimia dari isolat bakteri dengan informasi yang terdapat pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Hasil perbandingan dapat dilihat pada Tabel 5.5.

Tabel 5.5 Hasil Perbandingan Hasil Identifikasi Isolat Bakteri dengan Informasi dari *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*

Jenis uji biokimia	Bakteri putih	Genus <i>Bacillus</i>	Bakteri ungu	Genus <i>Bacillus</i>	Bakteri kuning	Genus <i>Clavibacter</i>
Fermentasi karbohidrat						
: - glukosa	+g(-)	+g(-)	+/- g()	+g(-)	-	+g(-)
- laktosa	-	+g(-)	-	+g(-)	-	-
- sukrosa	-	-	-	-	-	-
- maltosa	-	+g(-)	-	+g(-)	-	-
- manitol	-	-	-	-	-	-
TSIA	+/ H <sub>2</sub> S(+)	+	+H <sub>2</sub> S(+)	+	+/-/ H <sub>2</sub> S(+)	+/-/ H <sub>2</sub> S(+)
Motilitas	+	+	-	+	-	-
Indol	-	-	+	-	-	-
Sitrat	-	-	-	-	+	+
MR	+	-	+	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-

Dari Tabel 5.5, diketahui bahwa bakteri putih diduga termasuk pada genus *Bacillus*, bakteri ungu diduga termasuk pada genus *Bacillus* dan bakteri kuning diduga termasuk pada genus *Clavibacter*.

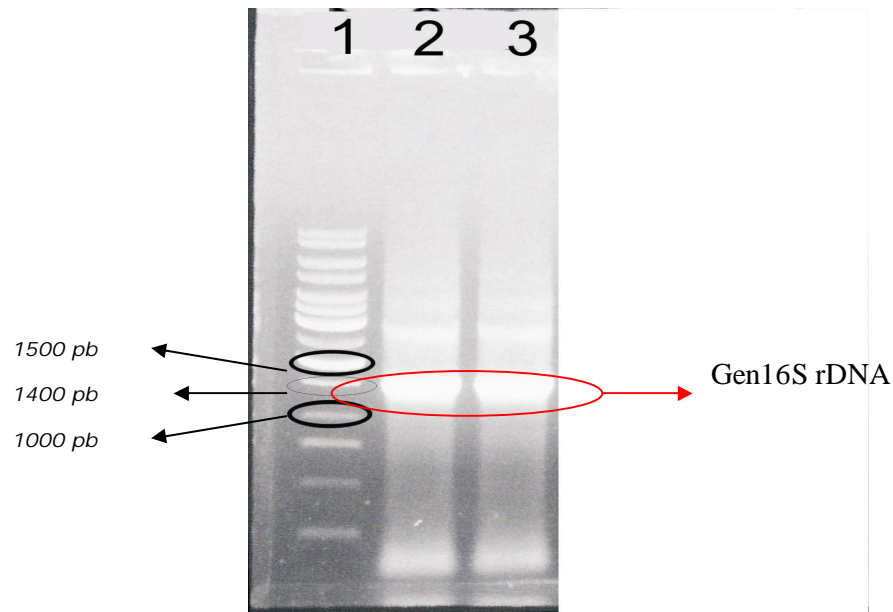
### **5.3.4 Hasil Identifikasi Salah Satu Bakteri Penghasil Antibakteri Melalui Penentuan Urutan 16S rDNA**

#### **A. Hasil Isolasi DNA Total**

Pada proses isolasi DNA total dari salah satu bakteri penghasil antibakteri (bakteri putih), isolasi DNA dilakukan secara enzimatik dengan menggunakan lisozim, karena metode ini lebih banyak menghasilkan DNA dibandingkan cara mekanis. Penambahan RNase bertujuan untuk menguraikan RNA, karena keberadaan RNA dapat mengkontaminasi isolat DNA. Keberadaan protein dalam isolat DNA juga dapat mengganggu proses amplifikasi PCR, terutama jika protein tersebut adalah suatu DNase yang dapat menguraikan DNA. Dari proses isolasi ini diperoleh DNA total sebesar 300 ng. Hasil isolasi ini mencukupi sebagai DNA templat, karena untuk proses amplifikasi PCR hanya diperlukan DNA sebesar 25-50 ng.

#### **B. Hasil Amplifikasi Gen 16S rDNA melalui PCR**

Dari hasil amplifikasi gen 16S rDNA melalui PCR diperoleh elektroforegram pada Gambar 4.1



Gambar 5.17 Elektroforegram hasil amplifikasi gen 16S rDNA dari isolat salah satu bakteri penghasil antibakteri (bakteri putih)

Keterangan:

- 1 : marka DNA 1kb DNA *ladder*.  
 2 dan 3 : produk PCR dari DNA penghasil antibakteri (bakteri putih)

Dari elektroforegram pada Gambar 4.1, terdapat beberapa pita DNA, namun hanya ada satu pita dominan berukuran sekitar 1.400 pb. Ukuran pita/fragmen DNA tersebut sesuai dengan ukuran gen 16S rDNA, yaitu 1400 pb. Oleh karena pada gel juga terdapat pita-pita lainnya merupakan produk amplifikasi yang tidak spesifik, maka perlu dilakukan pemurnian dari fragmen gen 16S rDNA.

### C. Hasil Pemurnian Fragmen 16S rDNA

Proses pemurnian menggunakan kolom GFX menghasilkan fragmen 16S rDNA murni dengan konsentrasi berkisar 25-50 ng. Konsentrasi ini mencukupi untuk DNA templat pada proses sekuensing.

#### D. Hasil Penentuan Urutan (Sekuensing) Fragmen 16S rDNA

Proses sekuensing dilakukan terhadap 600 pb, yang merupakan bagian awal dari 16S rDNA (1.400 pb). Pembacaan urutan sepanjang 600 pb cukup untuk menentukan kespesifikan suatu spesies. Hasil penentuan urutan (sekuensing) fragmen 16S rDNA dapat dilihat pada Gambar 5.18 dan Gambar 5.20, Lampiran 5.

1	AACGCCCGGA	AATGGGATTA	AGAGCTTGCT	CTTATGAAGT
	TAGCGGCGGA			
51	CGGGTGAGTA	ACACGTGGGT	AACCTGCCCA	TAAGACTGGG
	ATAACTCCGG			
101	GAAACCGGGG	CTAATACCGG	ATAACATTTT	GAACCGCATG
	GTTCGAAATT			
151	GAAAGGCGGC	TTCGGCTGTC	ACTTATGGAT	GGACCCGCGT
	CGCATTAGCT			
201	AGTTGGTGAG	GTAACGGCTC	ACCAAGGCAA	CGATGCGTAG
	CCGACCTGAG			
251	AGGGTGATCG	GCCACACTGG	GA CTGAGACA	CGGCCCAGAC
	TCCTACGGGA			
301	GGCAGCAGTA	GGGAATCTTC	CGCAATGGAC	GAAAGTCTGA
	CGGAGCAACG			
351	CCGCGTGAGT	GATGAAGGCT	TTCGGGTCGT	AAA ACTCTGT
	TGTTAGGGAA			
401	GAACAAGTGC	TAGTTGAATA	AGCTGGCACC	TTGACGGTAC
	CTAACCAGAA			
451	AGCCACGGCT	AACTACGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAATACGT
	AGGTGGCAAG			
501	CGTTATCCGG	AATTATTGGG	CGTAAAGCGC	GCGCAGGTGG
	TTTCTTAAGT			
551	CTGATGTGAA	AGCCCACGGC	TCAACCGTGG	AGGGTCATTG
	GAAACTGGGA			
601	GACTTGAG			

Gambar 5.18 Hasil penentuan urutan (sekuensing) fragmen 16S rDNA dari isolat salah satu bakteri penghasil antibakteri (bakteri putih)

Hasil BLAST urutan nukleotida tersebut terhadap *data base* 16S rDNA yang terdapat dalam situs [www.ncbi.nlm.nih](http://www.ncbi.nlm.nih) dapat dilihat pada Tabel 5.6

Tabel.5.6 Hasil BLAST urutan fragmen 16S rDNA isolat salah satu bakteri penghasil antibakteri (bakteri putih) terhadap *data base* 16S rDNA

<i>Accession No.</i>	<i>Description</i>	<i>Max score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query coverage</i>	<i>E value</i>	<i>Max ident</i>
DQ286348.1	<i>Bacillus thuringiensis serotype H46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1101	1101	98%	0.0	99%
EU104735.1	<i>Bacillus thuringiensis strain Q48-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1098	1098	98%	0.0	99%
AB244465.1	<i>Bacillus cereus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:C10-1</i>	1098	1098	98%	0.0	99%
AB244464.1	<i>Bacillus cereus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:C7-2</i>	1098	1098	98%	0.0	99%
AM747221.1	<i>Bacillus cereus partial 16S rRNA gene and ITS1, strain INRA C43</i>	1098	1098	98%	0.0	99%

Keterangan :

- Accession No.* : Nomor akses  
*Max score* : Nilai kesamaan (identik) pasang basa  
*Total Score* : Nilai keseluruhan  
*Query coverage* : Persentase sampel  
*E value* : Persentase kesalahan  
*Max Identify* : Persentase keakuratan identifikasi

Dari Tabel 5.6, diketahui bahwa urutan basa dari salah satu bakteri penghasil antibakteri (bakteri putih) yang diisolasi dari cairan kantung tanaman kantong semar (*N. ampullaria*) mempunyai kemiripan tertinggi dengan *Bacillus thuringiensis serotype H46*, dengan nilai kesamaan pasangan basa (*max score*) 1011, nilai total pasangan basa (*total score*) 1011, persentase analisis keseluruhan (*query coverage*) 98%, persentase kesalahan dalam proses (*E value*) 0,0 dan presentase keakuratan

identifikasi (*max identify*) 99 %. Urutan pasang basa hasil *Alligment* dapat dilihat pada gambar 5.19

```

Query 9   GAAATGGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG 68
        |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 5   GAAAT -GGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG 63

Query 69  GTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATT 128
        |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 64  GTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATT 123

Query 129 TTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGC 188
        |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 124 TTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGC 183

Query 189 GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG 248
        |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 184 GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG 243

Query 249 AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG 308
        |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 244 AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG 303

Query 309 TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG 368
        |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 304 TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG 363

Query 369 CTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA 428
        |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 364 CTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA 423

Query 429 CCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC 488
        |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 424 CCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC 483

Query 489 GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAA 548
        |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 484 GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAA 543

Query 549 GTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAG 608
        |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 544 GTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAG 603

```

Gambar 5.19 Gambar *Alligment* pasangan basa antara bakteri sampel dengan *Bacillus thuringiensis serotype H46* hingga urutan protein ke 600 pb

## **BAB VI**

### **SIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1 Simpulan**

Dari hasil isolasi dan pemurnian bakteri dari cairan kantung tanaman kantong semar, dihasilkan tiga koloni bakteri, yaitu bakteri koloni putih, ungu, dan kuning. Ketiga bakteri tersebut menghasilkan zat antibakteri yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis*, dengan aktivitas terbesar dihasilkan bakteri ungu. Zat antibakteri dari bakteri putih dan kuning juga mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*, dengan aktivitas terbesar dihasilkan oleh antibakteri dari koloni ungu.

Hasil identifikasi melalui pengamatan morfologi koloni, pengamatan mikroskopis (dengan pewarnaan Gram, spora dan kapsul) menunjukkan bahwa bakteri putih dan ungu termasuk genus *Bacillus* serta bakteri kuning termasuk genus *Clavibacter/Microbacterium*. Salah satu bakteri penghasil antibakteri (bakteri putih) diidentifikasi lebih lanjut melalui penentuan urutan fragmen 16S rDNA melalui metode PCR-sequencing. Hasil homologi fragmen 16S rDNA dari bakteri putih mempunyai kemiripan tertinggi dengan *Bacillus thuringiensis serotype H46*.

#### **6.2 Saran**

Dari hasil penelitian ini disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan terhadap antibakteri yang dihasilkan oleh ketiga isolat bakteri, khususnya bakteri



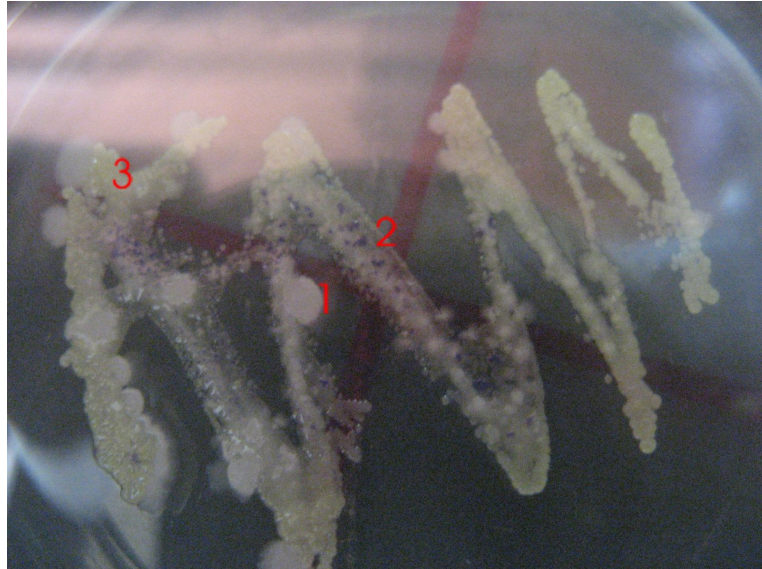
putih. Selain itu, disarankan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri lain dalam komunitas bakteri cairan kantung tanaman kantong semar, yang mungkin mempunyai aktivitas farmakologi lainnya, seperti aktivitas antijamur, penghasil enzim protease dan sebagainya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Brown, T.A. 1995. *Gene Cloning an Introduction*, Third Edition. Chapman & Hall. London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras. P.27- 35.
- Canon, J., V. Lojanapiwatna, C. Raston, W. Sinchai and A. White. 1990. The Quinones of *Nepenthes rafflesiana* The Crystal Structure of 2,5-Dihydroxy-3,8-dimethoxy-7-methylnaphtho-1,4-quinone (Nepenthone-E) and a Synthesis of 2,5Dihydroxy-3-Methoxy-7-methylnaphtho-1,4-quinone (Nepenthone-C). *Aus J of Chem.* 33 (5). P.1073–1093. [diakses April 2007].
- Cappucino, J.G., and N. Sherman. 1987. *Microbiology: A Laboratory Manual*. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. California USA. P.127-148.
- Chan, Y., M. Qi, and W. Lu. 2005. *Carnivorous Plant-Nepenthes*. Roskilde University. Toronto. P.8.
- Crueger, W and A. Crueger. 1994. *BIOTECHNOLOGY: A Textboook of Industrial Microbiology*. Science Tech, Inc. USA. P.12-13, 54-59.
- Denyer, S.P., N.A. Hodges, and S.P. Gorman. 2004. *Pharmaceutical Microbiology*. Blackwell Publishing. Victoria, Australia. P.22.
- Elliot, W.H. and Daphne. 1997. *Biochemistry and Moleculer*. Oxford University Press. Oxford. P.50-57.
- Ganiswara, S.G. 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Fakultas Kedokteran-Universitas Indonesia. Jakarta. Hal.571-572.
- Higashi, S., N. Akinori, O. Hideki , A. Mikiko, and U. Toshiki. 1992. Analysis of Feeding Mechanism in a Pitcher of *Nepenthes Hybrida*. *J of Pl. Res.* P.47-54. [diakses April 2007].
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Stanley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Williams & Wilkins. Maryland, USA. P.559-595.

- Hugo, W.B and A.D. Russel. 1980. *Pharmaceutical Microbiology*. Blackwell Scientific Publication Oxford. London, Edinburgh, Melbourne. P.33-43.
- Innis, M.A., D.H.Gelfand and J.J. Snisky. 1990. *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc. Toronto, San Diego, Tokyo, London, Sydney. P.1498-1505.
- Jawetz, Melnick and Adelberg's. 1991. *Medical Microbiology*, Twentieth Edition. Prentice Hall International Inc. USA. P.80.
- Madigan M.T. 1997. *Biology of Microorganisms*, Eighth Edition. Prentice Hall International. New Jersey. P.459-460.
- Mansur, M. 2006. *Nepenthes, Kantong Semar yang Unik*. Penebar Swadaya. Jakarta. Hal.7-9.
- Milanda, T. 2001. *Amplifikasi Fragmen DNA 0,5 Kb Gen Chepalosporium Acremonium Galur Alam dan Mutasi Serta Penentuan Urutan Nukleotidanya*. Tesis Magister. ITB. Bandung. Hal.24-25.
- Norman, L. 2005. *Biochemical Test for Identifying Unknowns*. MCB 2010C Course Website. <http://web.fccj.edu/~lnorman/unknowns.htm?index=2#top> [diakses Juli 2007].
- Pelczar, M.J. and E.C.S. Chan. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Jilid 1. Ratna Siri Hadioetomo, Teja Imas, S. Sutarmi Tjitrosomo, Sri Lestari Angka, penerjemah. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia. Hal.81-91.
- Plummer, G.L. and T.H. Jackson 1963. Bacterial Activities within the Sarcophagus of the Insectivorous Plant, *Saraccenia flava*. *Am. Mid. Natur*, 64. P.462-469.
- Riedel, M., A. Eichner and R. Jetter. 2003. Slippery Surfaces of Carnivorous Plants: Composition of Epicuticular Wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers. *J.Pl.* 1 (1). P.87-97. [diakses Juli 2007].
- Shivas, RG and JF Brown.1989. Yeasts Associated with Fluid in Pitchers of *Nepenthes*. *CSA Illumina*. 93 (1). P.98-100. [diakses Juli 2007].
- Stanbury, P.F., A. Whitaker and S.J.Hall. 1995. *Principles of Fermentation Technology*. Second Edition. Pergamon Publicy Data. British. P.4-9.

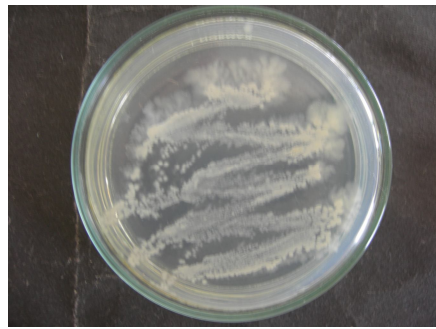
- Witarto, B.D., B. Saksono, dan A. Purnawan. 2006. Studi Biologi Molekular Tanaman Kantung Semar Menuju Pemanfaatannya. *Research Center for Biotechnology*. Indonesian Institute of Sciences. Hal.1-2. [diakses Juli 2007].
- Yogiara, A. Suwanto dan M.T. Suhartono. 2006. Analisis Komunitas Bakteri Cairan Kantung Semar (*Nepenthes spp.*) Menggunakan Teknik *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP) dan *Amplified Ribosomal DNA Analysis* (ARDRA). *Panduan Program dan Abstrak PIT-PERMI 2006*, OBD-4, VI-4.

**LAMPIRAN I****HASIL ISOLASI DAN PEMURNIAN BAKTERI DARI CAIRAN  
KANTUNG TANAMAN KANTONG SEMAR**

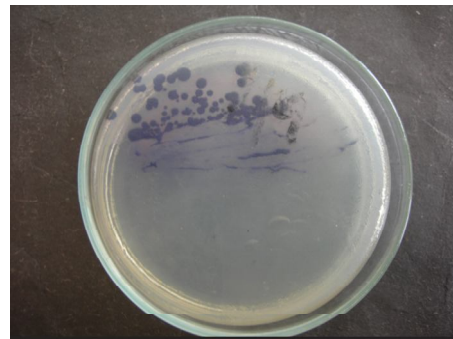
Gambar 5.1 Hasil isolasi bakteri dari cairan kantung tanaman kantong semar (*Nephentes ampullaria*)

Keterangan: 1 = Koloni bakteri Nomor 1  
2 = Koloni bakteri Nomor 2  
3 = Koloni bakteri Nomor 3

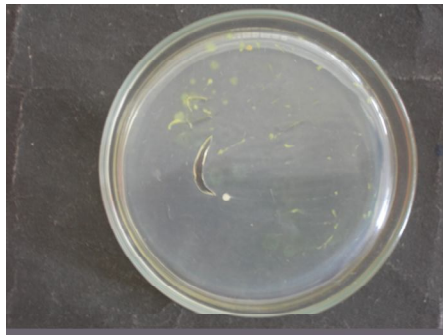
LAMPIRAN I  
(LANJUTAN)



(a)



(b)

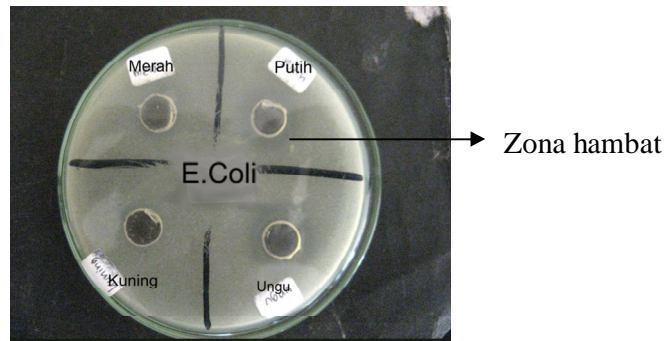


(c)

Gambar 5.2 Biakan murni isolat bakteri dari cairan kantung tanaman kantong semar (*Nepenthes ampullaria*)  
(a) Biakan murni bakteri putih  
(b) Biakan murni bakteri ungu  
(c) Biakan murni bakteri kuning

## LAMPIRAN II

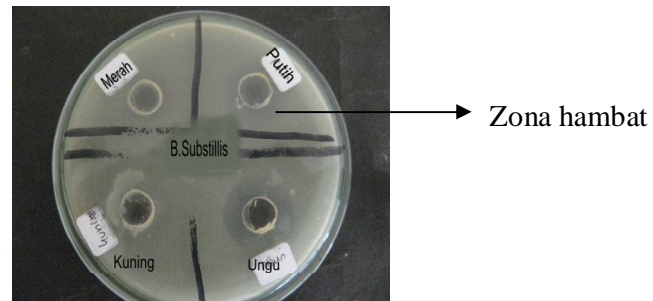
### HASIL PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI SUPERNATAN HASIL FERMENTASI TERHADAP BAKTERI UJI



Gambar 5.3 Hasil pengujian aktivitas antibakteri supernatan hasil fermentasi terhadap *E. coli*

Keterangan:

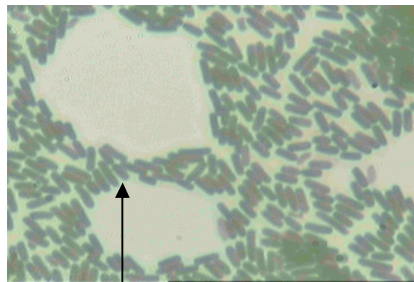
Pengujian dilakukan terhadap hasil fermentasi ketiga isolat bakteri



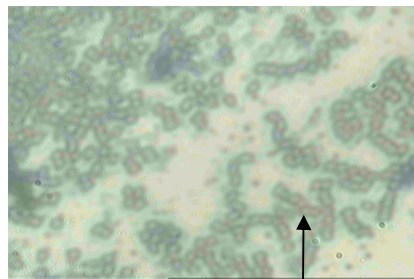
Gambar 5.4 Hasil pengujian aktivitas antibakteri supernatan hasil fermentasi terhadap *B. substillis*

Keterangan:

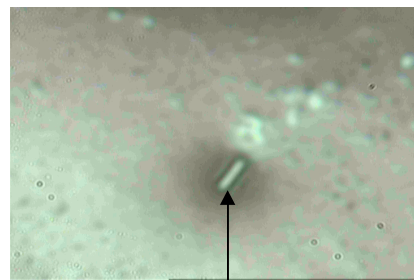
Pengujian dilakukan terhadap hasil fermentasi ketiga isolat bakteri

**LAMPIRAN III****HASIL IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI PENGHASIL ANTIBIOTIK  
MELALUI PENGAMATAN MIKROSKOPIK****Sel Bakteri**

Gambar 5.5 Hasil pewarnaan Gram dari bakteri Putih

**Endospora**

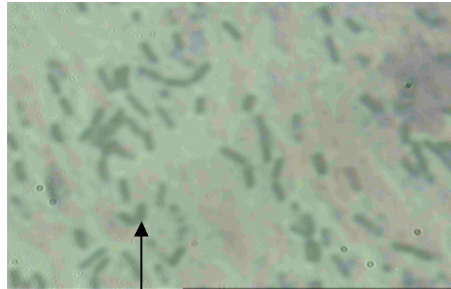
Gambar 5.6 Hasil pewarnaan spora dari bakteri putih

**Kapsul Bakteri**

Gambar 5.7 Hasil pewarnaan kapsul dari bakteri putih

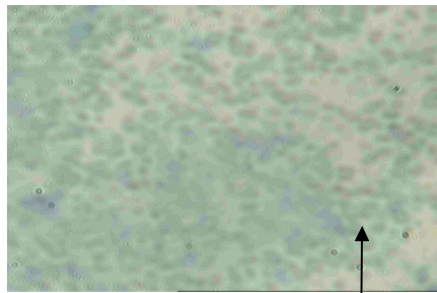


**LAMPIRAN III**  
**(LANJUTAN)**



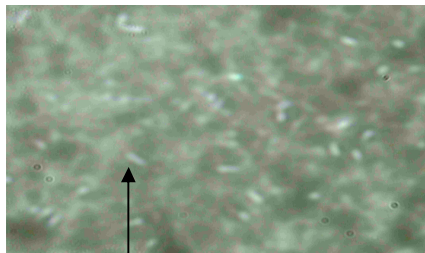
**Sel Bakteri**

Gambar 5.8 Hasil pewarnaan Gram dari bakteri ungu



**Endospora**

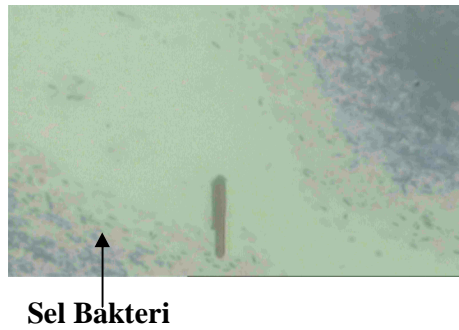
Gambar 5.9 Hasil pewarnaan spora dari bakteri ungu



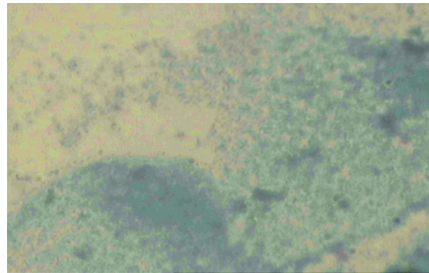
**Kapsul Bakteri**

Gambar 5.10 Hasil pewarnaan kapsul dari bakteri ungu

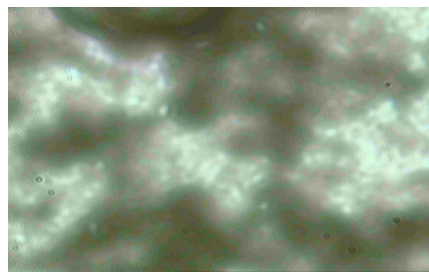
**LAMPIRAN III**  
**(LANJUTAN)**



Gambar 5.11 Hasil pewarnaan Gram dari bakteri kuning



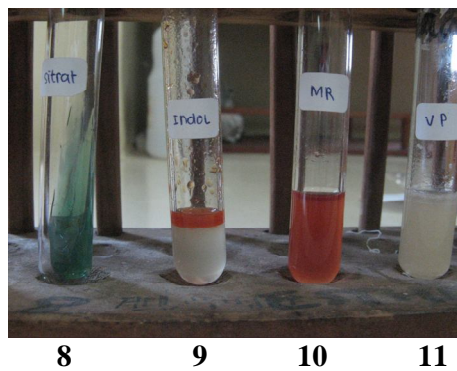
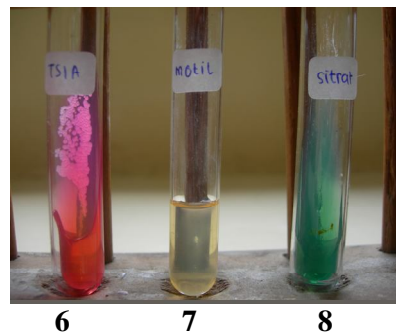
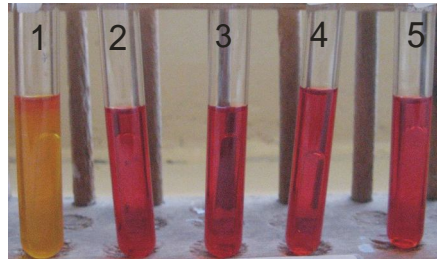
Gambar 5.12 Hasil pewarnaan spora dari bakteri kuning



Gambar 5.13 Hasil pewarnaan kapsul dari bakteri kuning

#### LAMPIRAN IV

#### HASIL IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI PENGHASIL ANTIBIOTIK MELALUI UJI BIOKIMIA

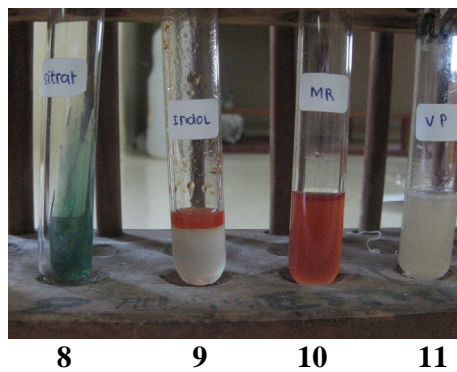
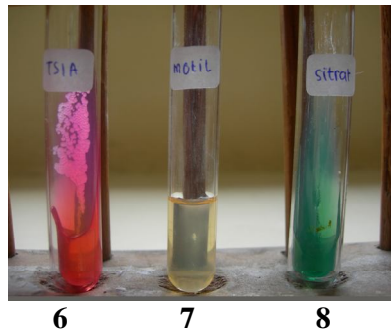
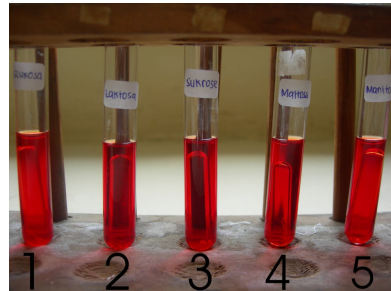


Gambar 5.14 Hasil identifikasi bakteri putih melalui uji biokimia

Keterangan:

1 = Glukosa	5 = Manitol	9 = Indol
2 = Laktosa	6 = TSIA	10 = MR
3 = Sukrosa	7 = Motil	11 = VP
4 = Maltosa	8 = Sitrat	

**LAMPIRAN IV**  
**(LANJUTAN)**

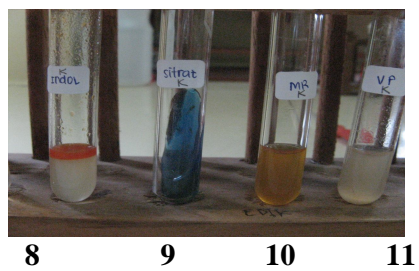
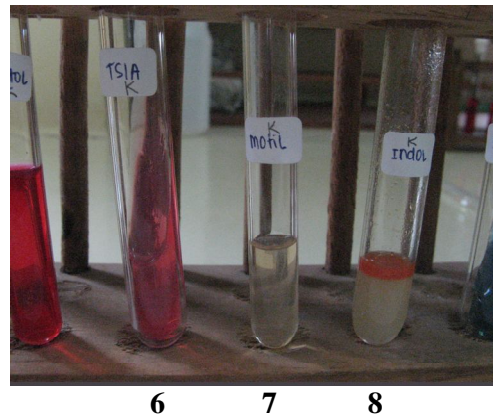
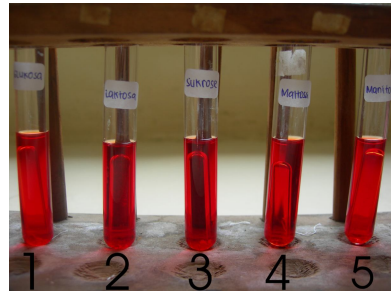


Gambar 5.15 Hasil identifikasi bakteri ungu melalui uji biokimia

Keterangan:

1 = Glukosa	5 = Manitol	9 = Indol
2 = Laktosa	6 = TSIA	10 = MR
3 = Sukrosa	7 = Motil	11 = VP
4 = Maltosa	8 = Sitrat	

**LAMPIRAN IV**  
**(LANJUTAN)**



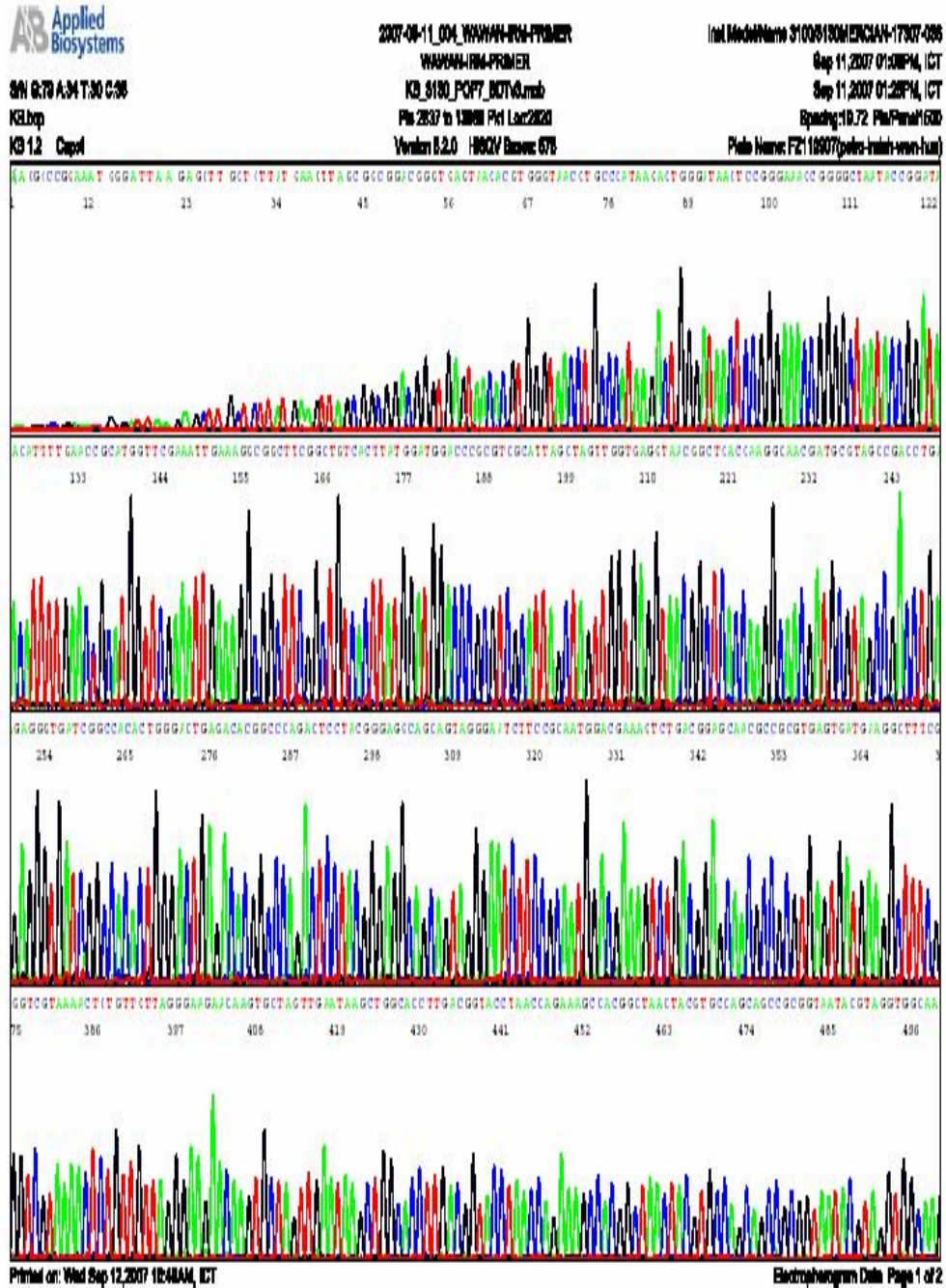
Gambar 5.16 Hasil identifikasi bakteri kuning melalui uji biokimia

**Keterangan:**

1 = Glukosa	5 = Manitol	9 = Indol
2 = Laktosa	6 = TSIA	10 = MR
3 = Sukrosa	7 = Motil	11 = VP
4 = Maltosa	8 = Sitrat	

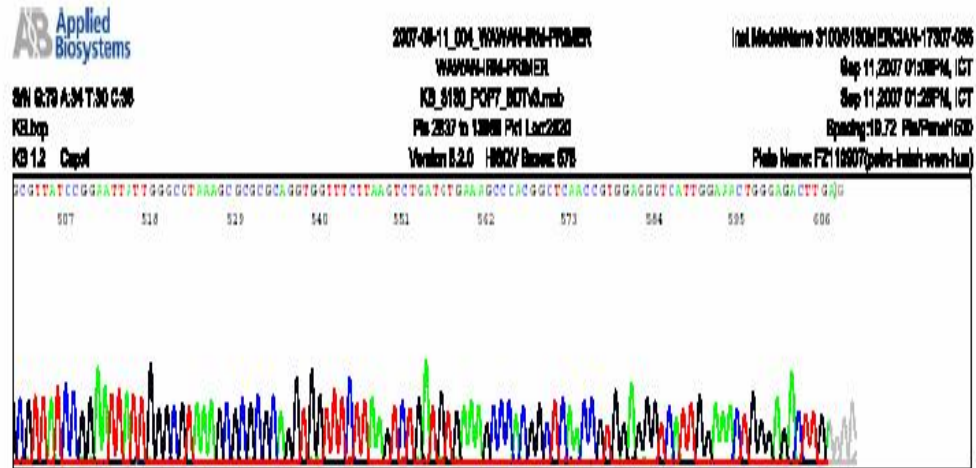
### LAMPIRAN V

## IDENTIFIKASI BAKTERI DENGAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERBESAR MELALUI PENENTUAN URUTAN 16S RDNA





LAMPIRAN V  
(LANJUTAN)



Gambar 5.18 Hasil penentuan urutan (sekuensing) fragmen 16S rDNA dari salah satu bakteri koloni putih penghasil antibiotik.