

**UJI AKTIVITAS SENYAWA ANTIBAKTERI *Bacillus* sp. DARI TANAH
KEBUN RAYA LIWA LAMPUNG BARAT TERHADAP *Dickeya* sp.**

(Skripsi)

Oleh

**LISA MARYATI
NPM 1757021002**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

**UJI AKTIVITAS SENYAWA ANTIBAKTERI *Bacillus* sp. DARI TANAH
KEBUN RAYA LIWA LAMPUNG BARAT TERHADAP *Dickeya* sp.**

Oleh

LISA MARYATI

Skripsi

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

Pada

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



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

ABSTRAK

UJI AKTIVITAS SENYAWA ANTIBAKTERI *Bacillus* sp. DARI TANAH KEBUN RAYA LIWA LAMPUNG BARAT TERHADAP *Dickeya* sp.

Oleh

LISA MARYATI

Kelompok *Bacillus* tanah banyak dilaporkan menghasilkan senyawa antibakteri terhadap bakteri patogen tanaman. Salah satu bakteri patogen tanaman yaitu *Dickeya* sp. yang menyebabkan penyakit busuk lunak pada organ daun, batang, dan akar tanaman. Kebun Raya Liwa (KRL) Lampung Barat memiliki kondisi tanah dan lingkungan yang memungkinkan ditemukannya keberadaan genus *Bacillus*. Telah berhasil ditemukan isolat *Bacillus* sp. TSR 6 asal tanah KRL. Isolat *Bacillus* sp. kode TSR 6 merupakan hasil skrining terbaik pada uji antagonis terhadap *Dickeya* sp. Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas senyawa antibakteri *Bacillus* sp. asal tanah KRL terhadap *Dickeya* sp. Isolat *Bacillus* sp. TSR 6 dikulturkan pada medium produksi antibakteri cair dan dilakukan ekstraksi menghasilkan ekstrak kasar etil asetat (222 mg) dan menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Dickeya* sp. Pemisahan senyawa ekstrak kasar dengan kromatografi kolom terbuka menghasilkan 8 fraksi dan terdapat 3 fraksi aktif yang menunjukkan hambatan terhadap *Dickeya* sp. pada uji aktivitas antibakteri melalui difusi agar cakram. Fraksi 54 memperlihatkan daya hambat terbesar dan tergolong kuat dengan zona hambat 13,5 mm pada konsentrasi stok 5000 µg/ml. Fraksi tersebut memiliki Kadar Hambat Minimum (KHM) pada konsentrasi 500 µg/ml berdasarkan nilai turbiditas dan pewarnaan resazurin melalui mikrodilusi cair. Hasil identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada fraksi aktif dengan eluen n-heksana:etil asetat (7:3) menunjukkan senyawa polar yang positif membentuk noda keunguan terhadap ninhidrin. Hal tersebut mengindikasikan bahwa senyawa pada fraksi aktif mengandung senyawa peptida.

Kata kunci: antibakteri, *Bacillus* sp., Kadar Hambat Minimum, Kromatografi Lapis Tipis.

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Bacillus* sp. FROM SOIL IN LIWA BOTANICAL GARDENS WEST LAMPUNG AGAINST *Dickeya* sp.

By

LISA MARYATI

Soil *Bacillus* groups have been reported to produce antibacterial compounds against plant pathogenic bacteria. One of the plant pathogenic bacteria is *Dickeya* sp. which causes soft rot disease in leaf, stems, and roots of plants organ. Liwa Botanical Garden (KRL) West Lampung has soil and environmental conditions that allow existence of the genus *Bacillus*. It has been successfully found isolates of *Bacillus* sp. TSR 6 from the soil of the KRL. The isolate with code TSR 6 of *Bacillus* sp. showed the best antagonistic activity against *Dickeya* sp. This study aims to determine antibacterial compound activity of the *Bacillus* sp. from soil in KRL against *Dickeya* sp. *Bacillus* sp. TSR 6 was cultured on liquid antibacterial production medium and extracted to produce crude ethyl acetate extract (222 mg) and showed antibacterial activity against *Dickeya* sp. Fractionation of compounds in crude extract by open column chromatography resulted in 8 fractions and there were 3 active fractions which showed inhibition against *Dickeya* sp. on the antibacterial activity test via agar disc diffusion. Fraction 54 showed the strongest inhibition with an inhibition zone 13.5 mm at a stock concentration 5000 ug/ml. This fraction has a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) at concentration 500 g/ml based on turbidity value and resazurin assay via broth microdilution. The identification of compounds in active fractions by Thin Layer Chromatography (TLC) with eluent n-Hexane:IPA (7:3) showed polar compounds and positive results in ninhydrin by purplish stain. This indicated the compounds in active fractions have peptide compounds.

Keywords: Antibacterial, *Bacillus* sp., Minimum Inhibitory Concentration, Thin Layer Chromatography.

Judul Skripsi

: **UJI AKTIVITAS SENYAWA ANTIBAKTERI
Bacillus sp. DARI TANAH KEBUN RAYA
LIWA LAMPUNG BARAT TERHADAP
Dickeya sp.**

Nama Mahasiswa

: **Lisa Maryati**

Nomor Pokok Mahasiswa

: 1757021002

Program Studi

: Biologi

Fakultas

: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



MENYETUJUI

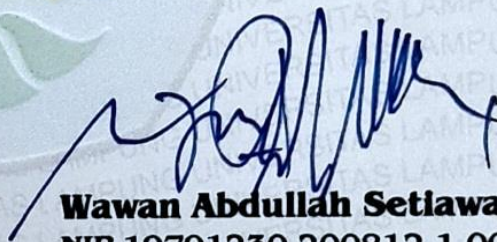
1. Komisi Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II



Dr. Kusuma Handayani, M.Si.
NIP 19780819 200801 2 018



Wawan Abdullah Setiawan, M.Si.
NIP 19791230 200812 1 001

2. Ketua Jurusan Biologi

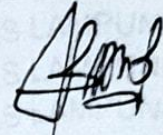


Drs. M. Kanedi, M.Si.
NIP 19610112 199103 1 002

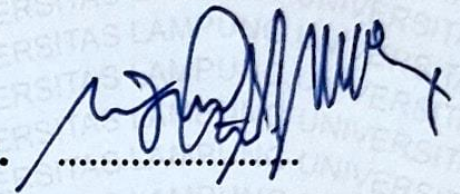
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

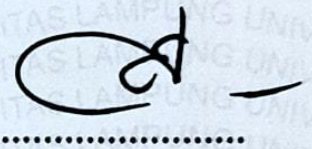
Ketua : **Dr. Kusuma Handayani, M.Si.**



Sekretaris : **Wawan Abdullah Setiawan, M.Si.**



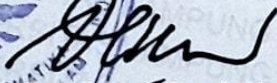
Penguji Utama : **Dra. C. Nugroho Ekowati, M.Si.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Sripito Dwi Yuwono, M.T.
NIP-19740705 200003 1 001



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **20 Juli 2022**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

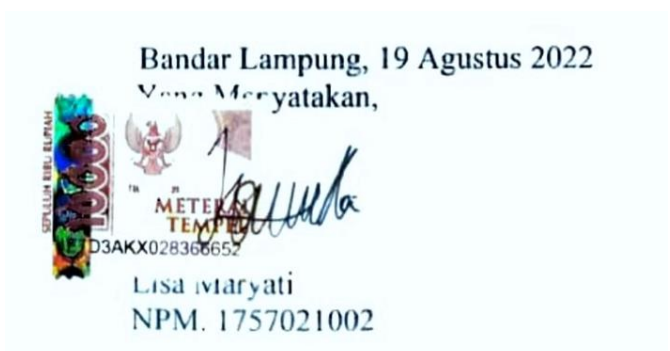
Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Lisa Maryati
NPM : 1757021002
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sejujurnya, bahwa karya ilmiah saya sebagai tugas akhir dalam bentuk skripsi yang berjudul:

**“UJI AKTIVITAS SENYAWA ANTIBAKTERI *Bacillus* sp. DARI TANAH
KEBUN RAYA LIWA LAMPUNG BARAT TERHADAP *Dickeya* sp.”**

secara keseluruhan baik data, hasil analisis, maupun penelusuran kajian ilmiahnya adalah benar hasil karya orisinal dan usaha saya sendiri berdasarkan riset yang telah dilakukan dan arahan dari komisi pembimbing dan pembahas. Karya ilmiah ini saya susun mengikuti norma dan etika penulisan yang berlaku. Saya memastikan bahwa tidak terdapat duplikasi dari karya ilmiah orang lain, kecuali terdapat pendapat yang tertulis jelas sebagai acuan untuk mendukung ulasan dengan menuliskan nama penulis dan dicantumkan di daftar pustaka. Apabila kelak terbukti bahwa pernyataan yang saya buat ini tidak benar, saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar sarjana maupun tuntutan hukum yang sedang berlaku.



RIWAYAT HIDUP



Lisa Maryati, lahir di Kota Cilegon Provinsi Banten pada tanggal 5 Desember 1999. Penulis merupakan anak ke-3 dari 4 bersaudara, dari Bapak Bunyamin dan Ibu Saadiyah.

Penulis mengawali pendidikannya sebagai murid Taman Kanak-Kanak (TK) di TK Bina Budi II Cilegon pada tahun 2004-2005. Penulis memulai wajib pendidikan di SD IT Unggulan Uswatun Hasanah Cilegon dari tahun 2005-2011, kemudian melanjutkan ke jenjang Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP Negeri 2 Cilegon dari tahun 2011-2014, selanjutnya masuk ke jenjang Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Negeri 2 Krakatau Steel Cilegon Jurusan Matematika dan Ilmu Alam (MIA) dari tahun 2014-2017. Penulis masuk ke Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) di Perguruan Tinggi Negeri Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Mandiri Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SMMPTN) Barat pada tahun 2017.

Mengawali karier sebagai mahasiswa, penulis kerap aktif di beberapa organisasi kemahasiswaan tingkat fakultas diantaranya yaitu sebagai sekretaris Bidang

Informasi dan Komunikasi (Infokom) Rohani Islam (Rois) FMIPA Unila periode 2019 dan anggota Bidang Komunikasi, Informasi, dan Hubungan Masyarakat (Kominhum) Himpunan Mahasiswa Jurusan Biologi (Himbio) FMIPA Unila periode 2018-2019.

Selain itu, penulis pernah melakukan Kerja Praktik (KP) di Laboratorium Mikrobiologi Lingkungan Pusat Penelitian (Puslit) Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Kab. Bogor, Jawa Barat pada tahun 2020 dan menghasilkan karya ilmiah berupa laporan kerja praktik yang berjudul “Evaluasi Kemampuan Jamur Campuran *Aspergillus* sp. dan *Paecilomyces* sp. yang Ditumbuhkan Pada Media Berbeda dalam Memberi Warna Kuning Pada Kain”. Penulis juga pernah aktif menjadi asisten di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Unila pada praktikum beberapa mata kuliah yaitu Mikrobiologi Umum, Bioteknologi, Fisiologi Mikroba, dan Mikrobiologi Tanah.

PERSEMBAHAN

Karya tulis ilmiah ini saya persembahkan sebagai salah satu bentuk pencapaian terbesar di dalam hidup saya untuk memenuhi tanggung jawab, amanah, dan harapan keluarga tercinta khususnya kepada kedua orang tua saya Bapak Bunyamin dan Ibu Saadiyah, S.Pd., menyusul kedua kakak saya Ferlyandi, S.T. dan Desi Haryati, S.Pd., serta adik saya Fatir Ali Mufti.

“So, undoubtedly, along with the hardship there is ease. So, when you are free (from collective services), toil hard (in worship)”
(Al-Inshirah: 5-6)

“Don’t be sorrowful, surely Allah with us”
(At-Taubah: 40)

“Wind up, what did you start”
(Ranah Tiga Warna)

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah *rabbilalamin*, puji dan syukur kehadiran Allah SWT atas segala ridho dan kesempatan-Nya, saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini yang berjudul **“Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri *Bacillus sp.* dari Tanah Kebun Raya Liwa Lampung Barat Terhadap *Dickeya sp.*”** Salawat dan salam tak lupa tercurahkan kepada suri tauladan Nabi Muhammad SAW yang telah membawa umatnya ke zaman yang penuh dengan ilmu pengetahuan.

Karya tulis ini ditujukan sebagai syarat dalam meraih gelar Sarjana Sains di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Pada kesempatan ini, saya mengucapkan terimakasih kepada:

1. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung;
2. Bapak Drs. M. Kanedi, M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung;
3. Ibu Dr. Kusuma Handayani, S. Si., M.Si. selaku Kepala Program Studi S1 Biologi sekaligus pembimbing I yang telah bersedia memberikan topik penelitian dan pendanaan selama penelitian, serta terimakasih telah memberikan bimbingan, arahan, dan masukan dengan sangat baik selama penelitian dan penyusunan skripsi ini;
4. Bapak Wawan A Setiawan, S. Si., M. Si. selaku pembimbing II yang telah bersedia memberikan bimbingan, arahan, masukan, serta dorongan dengan sangat baik selama penelitian dan penyusunan skripsi ini;
5. Ibu Dra. Christina Nugroho Ekowati, M.Si. selaku pembahas yang telah memberikan masukan dan arahan terkait penulisan dan pembahasan yang membangun penyusunan skripsi ini;

6. Bapak Dr. Andi Setiawan, M.Sc. yang telah memberikan arahan dan ilmu selama penulis melakukan penelitian di UPT LTSIT Universitas Lampung;
7. Bapak Tugiyono, Ph.D. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan masukan dan arahan;
8. Terkhusus untuk Ibu Oni Mastuti, S. Si. selaku laboran Laboratorium Mikrobiologi yang selalu menemani selama penelitian, memberikan dukungan, dan kehangatan di Laboratorium Mikrobiologi;
9. Teman-teman seperjuangan yang selalu mengingatkan akan kebaikan, memberi semangat, dan motivasi Umilia Fitriyani, Aprilia Eka Putri, S.Si., Niken Ayuandira, dan Faradhila Amanda, S.Si.;
10. Teman-teman selama penelitian di Lab. Mikrobiologi generasi 2017 (*Mintuy*) dan terkhusus yang berjuang hingga akhir generasi: Tim BKS (Indriani, Vidia Royanti, Ria Novitasari, Suciani Miftahul Jannah, dan Fadlina Athfin), Nuri Oktavia, dan Lailatul Farihah;
11. Rekan-rekan yang telah bersedia membantu dan memberikan arahan serta ilmu selama penelitian di UPT LTSIT Unila, Kak Arik Irawan, S.Si., M.Si, Mbak Tya Gita Putri Utami, S.Si., M.Si., Indra Prasetya, Kak Fendi Setiawan, S.Si., dan Mbak Zahra Khairani;
12. Semua pihak yang terlibat dan tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian serta penyusunan skripsi ini.

Bandar Lampung, Agustus 2022

Lisa Maryati

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang dan Masalah.....	1
1.2. Tujuan	3
1.3. Kerangka Pemikiran.....	3
1.4. Hipotesis.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Kebun Raya Liwa	5
2.2. <i>Dickeya</i> sp. sebagai Bakteri Patogen Tanaman	7
2.3. Bakteri <i>Bacillus</i> sp.	10
2.3.1. Habitat <i>Bacillus</i> sp.	10
2.3.2. Morfologi <i>Bacillus</i> sp.	11
2.3.3. Karakteristik Fisiologi dan Biokimia <i>Bacillus</i> sp.....	14
2.3.4. Klasifikasi <i>Bacillus</i> sp.	14
2.3.5. Senyawa Antibakteri yang Dihasilkan oleh <i>Bacillus</i> sp.	15
2.4. Antibakteri	19
2.4.1. Penggolongan Antibakteri	19
2.4.2. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Antibakteri	31
2.5. Produksi Senyawa Antibakteri.....	23
2.6. Ekstraksi Senyawa Antibakteri	25
2.7. Identifikasi dan Pemisahan Senyawa Antibakteri.....	26
2.7.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	26
2.7.2. Kromatografi Kolom Terbuka.....	27

2.8. Uji Aktivitas Antibakteri.....	28
2.8.1. Difusi Agar Cakram (<i>Agar Disk-Diffusion Method</i>)	28
2.8.2. Mikro Dilusi Cair (<i>Broth Micro Dilution</i>)	29
III. METODE PENELITIAN	32
3.1. Waktu dan Tempat	32
3.2. Alat dan Bahan	32
3.3. Metode	33
3.4. Pelaksanaan	34
3.4.1. Produksi Senyawa Antibakteri <i>Bacillus</i> sp. TSR 6	34
3.4.2. Ekstraksi Senyawa Antibakteri <i>Bacillus</i> sp. TSR 6	35
3.4.3. Identifikasi Senyawa Antibakteri <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	36
3.4.4. Skrining Awal Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 terhadap <i>Dickeya</i> sp. dengan Difusi Agar Cakram.....	36
3.4.5. Pemisahan Senyawa Antibakteri <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 dengan Kromatografi Kolom Terbuka.....	38
3.4.6. Uji Aktivitas Kandidat Senyawa Antibakteri <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 terhadap <i>Dickeya</i> sp.	39
3.4.7. Analisis Data	43
3.5. Diagram Alir Penelitian	44
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	45
4.1. Hasil	45
4.1.1. Produksi Senyawa Antibakteri <i>Bacillus</i> sp. TSR 6	45
4.1.2. Ekstraksi Senyawa Antibakteri <i>Bacillus</i> sp. TSR 6	46
4.1.3. Identifikasi Senyawa Antibakteri Ekstrak Kasar <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	46
4.1.4. Skrining Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 terhadap <i>Dickeya</i> sp. dengan Difusi Agar Cakram	47
4.1.5. Pemisahan Senyawa Antibakteri <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 dengan Kromatografi Kolom Terbuka.....	48
4.1.6. Skrining Aktivitas Antibakteri Hasil Pemisahan Senyawa dari Ekstrak Kasar <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 dengan Difusi Agar Cakram ...	49
4.1.7. Kadar Hambat Minimum (KHM) Fraksi Senyawa Antibakteri <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 terhadap <i>Dickeya</i> sp.	51
4.2. Pembahasan.....	53
4.2.1. Identifikasi Senyawa Antibakteri Ekstrak Kasar <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	53
4.2.2. Skrining Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 terhadap <i>Dickeya</i> sp. dengan Difusi Agar Cakram.....	54
4.2.3. Pemisahan Senyawa Antibakteri <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 dengan Kromatografi Kolom Terbuka.....	56

4.2.4. Skrining Aktivitas Antibakteri Hasil Pemisahan Senyawa dari Ekstrak Kasar <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 dengan Difusi Agar Cakram ...	56
4.2.5. Kadar Hambat Minimum (KHM) Fraksi Senyawa Antibakteri <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 terhadap <i>Dickeya</i> sp.	61
V. SIMPULAN DAN SARAN	64
5.1. Simpulan	64
5.2. Saran	64
DAFTAR PUSTAKA	66
LAMPIRAN	76
Tabel 7-9	76-80
Gambar 24-29.....	80-83

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Senyawa antibakteri dari <i>Bacillus</i> berdasarkan jalur biosintesisnya (Caulier <i>et al.</i> , 2019)	18
2. Klasifikasi senyawa lipopeptida yang dihasilkan kelompok <i>Bacillus</i> (Caulier <i>et al.</i> , 2019)	19
3. Klasifikasi antibakteri berdasarkan struktur kimia (Etebu <i>and</i> Arikekpar, 2016; Ullah <i>and</i> Ali, 2017)	20
4. Perhitungan zona hambat dari aktivitas antibakteri ekstrak kasar <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 terhadap <i>Dickeya</i> sp.	48
5. Perhitungan zona hambat fraksi aktif kandidat senyawa antibakteri terhadap <i>Dickeya</i> sp.	49
6. Nilai KHM fraksi aktif dalam menghambat <i>Dickeya</i> sp.	51
7. Nilai turbiditas Sel <i>Dickeya</i> sp. pada penentuan KHM pada λ 600 nm setelah masa inkubasi 18 jam	76
8. Pengukuran nilai turbiditas sel <i>Dickeya</i> sp. pada penentuan KHM setelah 2 jam pewarnaan resazurin.....	77
9. Pengukuran nilai turbiditas sel <i>Dickeya</i> sp. pada penentuan KHM setelah 4 jam pewarnaan resazurin.....	79

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Peta Kebun Raya Liwa (Bidang Pengembangan Kawasan Konservasi Tumbuhan <i>Ex Situ</i> Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya LIPI, 2016)..6	
2. Kenampakan koloni beberapa strain <i>Dickeya</i> spp. pada beberapa media agar (Casamino Acid Glucose (CPG), Luria Bertani (LB), BUG medium, dan King's B medium) (Alic et al., 2018)..... 7	
3. Penyakit busuk lunak pada tanaman hias anggrek akibat infeksi <i>Dickeya fangzhongdai</i> (Chi et al., 2021)9	
4. Morfologi mikroskopik pengecatan Gram <i>Bacillus</i> spp. pada perbesaran 100× (Royanti., 2022)..... 11	
5. Struktur endospora <i>Bacillus</i> sp. (Turnbull, 2004)12	
6. Morfologi koloni <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> berumur 24 jam yang ditumbuhkan pada media LB agar (Liu et al., 2010)..... 13	
7. Klasifikasi senyawa antimikroba dari <i>B. subtilis</i> berdasarkan jalur biosintesisnya (Caulier et al., 2019)16	
8. Struktur senyawa kelompok lipopeptida (Caulier et al., 2019).....17	
9. Skema biosintesis surfactin pada <i>B. subtilis</i> (Wang et al., 2019).....24	
10. Pemisahan senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis (Reddy, 2018).....26	
11. Pemisahan senyawa dengan kromatografi kolom terbuka (Torres, 2016) ...28	
12. Metode Kirby-bauer pada uji aktivitas antibakteri terhadap <i>P. aeruginosa</i> sesuai standar CLSI (Bhatt et al., 2015).....29	

13.	(a) penentuan KHM dengan pewarnaan resazurin pada mikrodilusi (Elshikh <i>et al.</i> , 2016); (b) reduksi resazurin menjadi resofurin pada sel bakteri hidup (Chen <i>et al.</i> , 2017; Elshikh <i>et al.</i> , 2016)	31
14.	Rumus perhitungan diameter zona hambat (Winastri dkk., 2020)	37
15.	Diagram alir penelitian	44
16.	Kultur <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 dengan media produksi antibakteri cair hari ke-3	45
17.	Hasil KLT Ekstrak Kasar EtOAc <i>Bacillus</i> sp. TSR 6. (a) visualisasi UV 254 nm; (b) visualisasi dengan serum sulfat.....	46
18.	Aktivitas antibakteri ekstrak kasar <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 terhadap <i>Dickeya</i> sp. (a) ekstrak kasar <i>Bacillus</i> sp.; (b) kontrol positif kloramfenikol; (c) kontrol negatif MeOH. Keterangan: C: Cakram; Kb: Koloni bakteri; Zh: Zona hambat.....	47
19.	Hasil KLT dari fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom terbuka. (a) visualisasi UV 254 nm; (b) reaksi dengan serum sulfat	48
20.	Aktivitas antibakteri fraksi hasil pemisahan senyawa dari ekstrak kasar <i>Bacillus</i> sp. TSR 6 terhadap <i>Dickeya</i> sp.....	50
21.	Hasil KLT ketiga fraksi aktif yang mampu menghambat <i>Dickeya</i> sp. (a) visualisasi UV 254 nm; (b) serum sulfat; (c) ninhidrin	51
22.	Perbandingan nilai turbiditas sel <i>Dickeya</i> sp. pada penentuan KHM setelah inkubasi 18 jam.....	52
23.	Penentuan KHM fraksi aktif melalui mikrodilusi dengan pewarnaan resazurin.....	53
24.	Perbandingan nilai turbiditas sel <i>Dickeya</i> sp pada penentuan KHM setelah 2 jam pewarnaan resazurin	80
25.	Perbandingan nilai turbiditas sel <i>Dickeya</i> sp pada penentuan KHM setelah 4 jam pewarnaan resazurin	81
26.	Proses partisi filtrat pekat dengan pelarut EtOAc. (a) dua fraksi hasil partisi; (b) fraksi EtOAc	81

27. Pemisahan senyawa kandidat antibakteri dari ekstrak kasar *Bacillus* sp. TSR 6 dengan kromatografi kolom terbuka.....82
28. Fraksi-fraksi hasil pemisahan senyawa kromatografi kolom82
29. Proses evaporasi penyiapan sampel senyawa uji.....83

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang dan Masalah

Kebun Raya Liwa (KRL) sebagai kawasan konservasi tumbuhan secara *ex-situ* yang berada di Lampung Barat merupakan kebun raya daerah bertema tanaman hias Indonesia tentunya memiliki beragam koleksi tanaman hias (Pusat Konservasi Tumbuhan LIPI, 2021). Namun, tanaman anggrek di KRL telah ditemukan penyakit busuk lunak (*soft rot*) yang disebabkan oleh infeksi bakteri patogen (Mahfut dkk., 2020).

Penyakit busuk lunak pada beberapa tanaman hias yang telah dilaporkan sebelumnya disebabkan oleh infeksi kelompok bakteri pektinolitik, salah satunya genus *Dickeya* (Raoul des Essarts *et al.*, 2016). Spesies *Dickeya* sp. diketahui banyak menyebabkan penyakit pada tanaman pertanian dan tanaman hias hampir di seluruh dunia (Toth *et al.*, 2011). Chi *et al.* (2021) melaporkan bahwa penyakit busuk lunak yang menyerang bagian daun pada beberapa anggrek epifit di Vietnam disebabkan oleh infeksi bakteri *Dickeya fangzhongdai*. Lebih lanjut, Parkinson *et al.* (2014) menegaskan bahwa *Dickeya dianthicola* yang menginfeksi tanaman hias dapat pula menginfeksi silang tanaman lainnya seperti tanaman hortikultura dan kentang.

Genus bakteri *Dickeya* termasuk ke dalam Gram negatif yang memiliki kemampuan pektinolitik sebagai aktivitas patogenitasnya terhadap tanaman (Boluk *et al.*, 2021; Wolf *et al.*, 2014). *Dickeya* menginfeksi tanaman melalui bagian yang terbuka pada jaringan epidermis seperti lentisel, luka

mekanis, atau zona pemanjangan akar kemudian mensekresikan enzim pektinase yang dapat mendegradasi pektin pada lamella tengah dan dinding sel primer tanaman (Hossain *et al.*, 2020; Raoul des Essarts *et al.*, 2016), akibatnya organ tanaman inang yang terinfeksi akan termaserasi dan perlahan membusuk (Boluk *et al.*, 2021).

Studi terkait pengendalian penyakit busuk lunak akibat infeksi bakteri genus *Dickeya* telah banyak dilaporkan. Namun, penanganan penyakit tanaman masih banyak dilakukan dengan metode kimiawi terkait dengan efektivitas dan hasil yang menguntungkan secara ekonomi tanpa mempertimbangkan dampak negatif bagi lingkungan dan makhluk hidup (Arif, 2015).

Pengendalian secara biologi terhadap kasus penyakit bakteri fitopatogen *Dickeya* sp. menjadi salah satu alternatif yang cukup baik dan ramah lingkungan. Mikroorganisme tanah telah banyak diteliti sebagai kandidat agen hayati untuk mengendalikan bakteri fitopatogen.

Beberapa spesies dari genus *Bacillus* asal tanah diketahui memiliki kemampuan memproduksi senyawa antibakteri dan dapat mengendalikan beberapa bakteri fitopatogen, termasuk bakteri Gram negatif seperti *Dickeya* (Caulier *et al.*, 2019; Tinajero *et al.*, 2021). Selain itu, bakteri *Bacillus amyloliquifaciens* dan *Serratia plymuthica* telah dimanfaatkan sebagai agen hayati dalam mengendalikan genus *Dickeya* (Hossain *et al.*, 2020; Czajkowski *et al.*, 2011). Bakteri *Bacillus* sp. diketahui termasuk bakteri yang dominan di dalam tanah (Li *et al.*, 2020). Keberadaan genus *Bacillus* kemungkinan tersebar juga pada tanah KRL. Kondisi tanah KRL yang didukung oleh faktor iklim seperti curah hujan tahunan yang cukup tinggi dengan rata-rata 2500-3000 mm, kelembaban relatif yang mencapai 50%-80%, dan tersedianya sumber air di beberapa tempat mampu menjaga kondisi kelembaban tanah yang memungkinkan tumbuhnya *Bacillus* sp. (Pusat Konservasi Tumbuhan LIPI, 2021). Penelitian sebelumnya terkait *Bacillus* indegenus sebagai agen biokontrol terhadap *Dickeya* telah dilaporkan oleh Tinajero *et al.* (2021). Beberapa genus *Bacillus* dapat memproduksi senyawa antibakteri lipopeptida diantaranya: kurstakins; iturin; surfactin; dan

fengycin (Dimkic *et al.*, 2017). Tiga golongan senyawa lipopeptida dari *Bacillus* yaitu: surfactin; iturin; dan fengycin banyak dipelajari terkait aktivitas antagonismenya dalam menghambat bakteri fitopatogen (Jacques, 2011). Hossain *et al.* (2020) melaporkan bahwa senyawa lipopeptida surfactin yang diisolasi dari *Bacillus amyloliquefaciens* A3 mampu menghambat bakteri fitopatogen *Dickeya dadantii*.

Keberadaan *Bacillus* indigenus di KRL yang berpotensi sebagai penghasil antibakteri belum diketahui. Berdasarkan hal tersebut, maka pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. asal tanah KRL terhadap bakteri patogen genus *Dickeya* penyebab penyakit pada tanaman.

1.2. Tujuan

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui aktivitas senyawa antibakteri *Bacillus* sp. asal tanah Kebun Raya Liwa Lampung Barat terhadap *Dickeya* sp. sebagai patogen tanaman.

1.3. Kerangka Pemikiran

Genus *Bacillus* asal tanah banyak dilaporkan mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder berupa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen tanaman. Keberadaan kandidat *Bacillus* sp. penghasil antibakteri diduga terdapat pada tanah KRL. Faktor lingkungan dapat mempengaruhi keberadaan *Bacillus* sp. Iklim yang terdapat di KRL memungkinkan tumbuhnya berbagai jenis mikroba tanah yang beragam. Keragaman jenis mikroba tersebut dapat menimbulkan persaingan dalam hal kebutuhan nutrisi dan ruang untuk bertahan hidup sehingga beberapa mikroba

termasuk *Bacillus* sp. dapat mensintesis antibiotik dengan aktivitas spesifik atau spektrum luas. Selain itu, biosintesis metabolit sekunder yang bersifat antibiotik dapat terjadi ketika kondisi lingkungan kurang menguntungkan bagi *Bacillus* sp. sebagai mekanisme pertahanan diri.

Melalui studi literatur telah diketahui bahwa *Bacillus* sp. yang berasosiasi dengan tanaman memiliki aktivitas antibakteri lipopeptida surfactin. Antibakteri tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Dickeya* sp., selanjutnya diketahui bahwa surfactin mampu merusak membran sel bakteri dengan mekanisme pembentukan pori yang menyebabkan struktur membran berubah. Hal tersebut mengakibatkan perubahan permeabilitas membran kemudian kebocoran isi sel dan pembersihan sitoplasma.

Sebelumnya telah berhasil didapatkan isolat *Bacillus* sp. asal tanah KRL dengan kode isolat TSR 6 yang memiliki zona hambat terhadap pertumbuhan *Dickeya* sp. Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan penelitian untuk menguji ada-tidaknya aktivitas senyawa antibakteri *Bacillus* sp. hasil isolasi dari tanah KRL tersebut terhadap patogen tanaman *Dickeya* sp.

1.4. Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini yaitu isolat *Bacillus* sp. TSR 6 asal tanah KRL mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Dickeya* sp. yang menginfeksi tanaman.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kebun Raya Liwa

Kebun Raya Liwa (KRL) adalah kawasan konservasi tumbuhan secara *ex-situ* yang bertujuan untuk kegiatan konservasi, penelitian, pendidikan, wisata, dan jasa lingkungan. Saat ini KRL menjalankan fungsinya sebagai kebun raya daerah dengan tema tanaman hias Indonesia. Pengelolaan KRL diserahkan kepada Dinas Kehutanan sejak tahun 2007 sampai dengan tahun 2016 dan pada 3 Januari 2017 pengelolaan KRL diserahkan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Kabupaten Lampung Barat (Bidang Pengembangan Kawasan Konservasi Tumbuhan *Ex Situ* Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya LIPI, 2016). KRL terletak di Desa Pekon Kubu Perahu, Kecamatan Balik Bukit, Liwa, Kabupaten Lampung Barat, Provinsi Lampung, dengan luas lahan 86,68 ha. Berdasarkan letak astronomisnya, KRL terletak pada titik koordinat 5° 02' 17.98" LS dan 104° 04' 34.27" BT. Di sisi barat, KRL berbatasan dengan ekowisata Kubu Perahu Resort Balik Bukut, Taman Nasional Bukit Barisan Selatan (TNBBS). KRL terletak pada ketinggian 800-900 mdpl dengan kondisi tanah bergelombang dan kemiringan lereng terjal. Kondisi iklim KRL meliputi curah hujan tahunan rata-rata 2500-3000 mm, bulan basah berlangsung 7 hingga 9 bulan, kisaran suhu lingkungan 17-30°C, kelembaban relatif 50-80%, dan intensitas cahaya matahari sebesar 37,9% (Wilyasari, 2020). Berdasarkan kondisi tersebut terdapat Gambaran peta KRL yang disajikan pada Gambar 1.

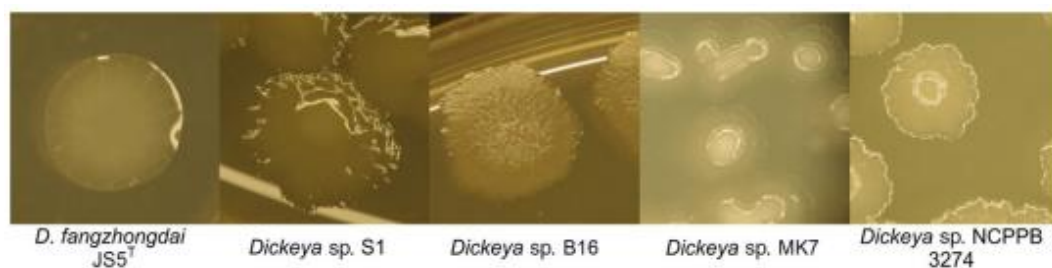


Gambar 1. Peta Kebun Raya Liwa (Bidang Pengembangan Kawasan Konservasi Tumbuhan *Ex Situ* Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya LIPI, 2016).

Terdapat pembagian wilayah taman pada KRL meliputi beberapa taman dan taman tematik yaitu taman tematik araceae, taman tematik buah, taman tematik hias, taman tematik wangi, taman tematik aren, taman pelangi, taman sakura, taman cinta, taman plaza penerima, taman tematik *Arecaceae*, taman tematik *Portulacaceae*, taman tematik kopi, dan taman tematik bambu. Jumlah koleksi tanaman di KRL berdasarkan data per Juni 2019 yaitu: (1) anggrek sebanyak 96 jenis dengan 945 spesimen, (2) *Araceae* sebanyak 25 jenis dengan 378 spesimen, (3) *Piperaceae* sebanyak 11 jenis dengan 69 spesimen, (4) *Begoniaceae* sebanyak 17 jenis dengan 165 spesimen, (5) *Aeschinanthus* sebanyak 2 jenis dengan 18 spesimen; (6) *Nepenthaceae* terdapat 8 spesimen, (7) *hoya* terdiri dari 1 jenis dengan 11 spesimen, (8) pembibitan terdapat 98 jenis dengan 2.118 spesimen, (9) kebun koleksi terdiri dari 170 jenis dengan 1.146 spesimen, (10) kebun obat terdiri dari 106 jenis dengan 819 spesimen.

2.2. *Dickeya* sp. sebagai Bakteri Patogen Tanaman

Dickeya merupakan bakteri fitopatogen Gram negatif, berbentuk batang, motil, termasuk ke dalam famili Pectobacteriaceae (ordo Enterobacteriales) (Boluk *et al.*, 2021). Genus *Dickeya* terbentuk dari adanya hibridisasi DNA dan karakterisasi biokimia bakteri pektinolitik (Ignatov *et al.*, 2018), sebelumnya diklasifikasikan sebagai *Erwinia chrysanthemi*, kemudian menjadi *Pectobacterium chrysanthemi* (Wolf *et al.*, 2014). Pemisahan spesies *P. chrysanthemi* dari genus bakteri *Pectobacterium* menjadi genus baru *Dickeya* diambil dari nama ahli mikrobiologi R. S. Dickey yang telah meneliti bakteri tersebut selama bertahun-tahun (Ignatov *et al.*, 2018). Genus *Dickeya* semula terbagi kedalam 6 spesies yaitu: *D. chrysanthemi*; *D. paradisiaca*; *D. dadantii*; *D. dianthicola*; *D. dieffenbachiae*; dan *D. zeae* (Sueno *et al.* (2014). Berdasarkan penelitian Alic *et al.* (2018) beberapa strain *Dickeya* spp. memiliki morfologi koloni bulat (*circular*), *umbonate*, dan *nonmuroid* pada beberapa media agar (*Casamino Acid Glucose* (CPG), *Luria Bertani* (LB), *BUG medium*, dan *King's B medium*), sedangkan *D. fangzhongdai* memiliki koloni *circular*, *muroid*, dan konsistensi yang berair. Kenampakan koloni beberapa strain *Dickeya* spp. tersebut disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Kenampakan koloni beberapa strain *Dickeya* spp. pada beberapa media agar (*Casamino Acid Glucose* (CPG), *Luria Bertani* (LB), *BUG medium*, dan *King's B medium*) (Alic *et al.*, 2018).

Kelompok bakteri *Dickeya* mampu menginfeksi beragam tanaman sebagai inang (*host*), meliputi tanaman pertanian dan tanaman hias, contohnya kentang, ubi, wortel, nanas, dan anggrek. Boluk *et al.* (2021) melaporkan berdasarkan analisis biomolekuler *D. zea* berasal dari *host* tanaman famili Araceae seperti *C. esculenta* dan *Philodendron*. Menurut penelitian Sueno *et al.* (2014) penyakit busuk lunak akibat *Dickeya* menginfeksi beberapa spesies tanaman sebanyak 35% pada ordo tanaman angiosperma.

Spesies *Dickeya* menyebabkan penyakit busuk lunak pada tanaman (Boluk *et al.*, 2021). Patogen masuk ke dalam *host* tanaman melalui lubang alami atau perlukaan pada tanaman, seperti lentisel, zona pemanjangan akar, atau perlukaan serangga (Raoul des Essarts *et al.*, 2015). Infeksi patogen diawali dengan pembentukan biofilm dengan matriks yang rumit pada permukaan tanaman dari sistem sekresi protein yang mengatur patogenitas *Dickeya* dalam pembentukan biofilm tersebut sehingga meningkatkan kapasitas bakteri untuk menginfeksi *host*. *Dickeya* mensintesis eksopolisakarida (EPS) sebagai komponen matriks biofilm untuk berikatan dengan permukaan sel *host*. *Dickeya* memproduksi berbagai enzim ekstraseluler, kebanyakan enzim PCWDEs meliputi pektinase, selulase, dan protease. Enzim tersebut berperan dalam memaserasi jaringan tanaman, memungkinkan kolonisasi bakteri yang berakibat berkembangnya penyakit (Boluk *et al.*, 2021). *Dickeya* mengkolonisasi di dalam jaringan vaskuler dan jaringan umbi (Czajowski *et al.*, 2011). Enzim ekstraseluler pektinase yang dihasilkan mendegradasi pektin pada dinding sel tanaman yang memiliki kandungan kompleks polimer selulosa, hemiselulosa, pektin, dan glikoprotein. Diantara polimer tersebut, pektin merupakan polimer yang paling kompleks, memiliki ikatan polygalacturonan dan sisi yang bercabang, *Dickeya* akan memperoleh nutrisi dari sel yang mati (Boluk *et al.*, 2021).

Suhu dapat mempengaruhi patogenitas *Dickeya*. Menurut studi oleh Ignatov *et al.*, (2018) menerangkan bahwa spesies *D. dianthicola* menyebabkan busuk lunak pada umbi pada suhu 27°C dan *D. solani* menyebabkan layu batang dan rusaknya cincin pembuluh di dalam umbi. Pada suhu optimum, patogen dapat membuat tanaman kerdil, daun menguning, mengecil, keras, dan terlipat sepanjang urat

tengah. Pada suhu rendah, tanaman yang terinfeksi dapat mengimbangi tanaman yang sehat, tetapi ketika terkena pemanasan, batang utama menjadi gelap, daun terkulai dan perlahan memudar. Infeksi tanaman tanpa gejala berlangsung dari musim semi hingga musim panen. Patogensitas dari strain *Dickeya* yang diisolasi dari tanaman nanas yang bergejala dan air irigasi dapat menghasilkan nekrosis coklat muda, kemudian terdapat strain yang menghasilkan tipe luka basah dan lepuh. Beberapa tidak menimbulkan gejala sementara beberapa yang lainnya dapat bergejala dengan menghasilkan luka coklat muda atau gejala busuk jantung. *Dickeya* yang diisolasi dari tanaman dan air dapat menyebabkan gejala yang khas pada daun setelah inokulasi (Sueno *et al.*, 2014). Contoh kenampakan penyakit busuk lunak pada tanaman hias akibat infeksi *Dickeya* sp. ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Penyakit busuk lunak pada tanaman hias anggrek akibat infeksi *Dickeya fangzhongdai* (Chi *et al.*, 2021).

Menurut Ignatov *et al.* (2018) terdapat dua penyebaran *Dickeya*, yaitu transfer melalui benih ke tanaman inang lainnya dan transfer melalui air hujan, irigasi, dan vektor hama. *Dickeya* dapat memiliki berbagai macam tanaman inang termasuk tanaman hias sehingga dapat menyebar luas ke seluruh dunia melalui perdagangan benih tanaman pangan dan tanaman hias. Serangga dapat berperan sebagai

vektor, permukaan air dan aerosol juga mendukung penyebaran patogen (Raoul des Essarts *et al.*, 2015). Sueno *et al.* (2014) melaporkan populasi *Dickeya* yang ditemukan di saluran air alami dan sumber air pada kota yang digunakan untuk ladang atau pembibitan merupakan virulen pada kentang. Pada beberapa wilayah, *Dickeya* merupakan salah satu bakteri mikroflora alami yang mengkontaminan dari perusahaan hortikultura dan argonomi.

Sejauh ini, senyawa antibakteri dari *Bacillus* sp. yang menghambat pertumbuhan *Dickeya* sp. baru dilaporkan oleh Hossain *et al.* (2020). Melalui penelitiannya, dilaporkan bahwa strain *B. amyloliquefaciens* A3 memiliki kemampuan memproduksi senyawa surfactin yang mampu menghambat pertumbuhan *Dickeya dadantii*. Senyawa tersebut termasuk golongan lipopeptida yang bekerja dengan mekanisme merusak membran sel bakteri. Surfactin merusak membran sel dengan melakukan penetrasi pada membran bilayer lipid. Penetrasi tersebut terjadi melalui interaksi hidrofobik dengan membran sel yang selanjutnya menyebabkan terbentuknya pori-pori pada membran sehingga permeabilitas membran berubah (Dimkic *et al.*, 2022).

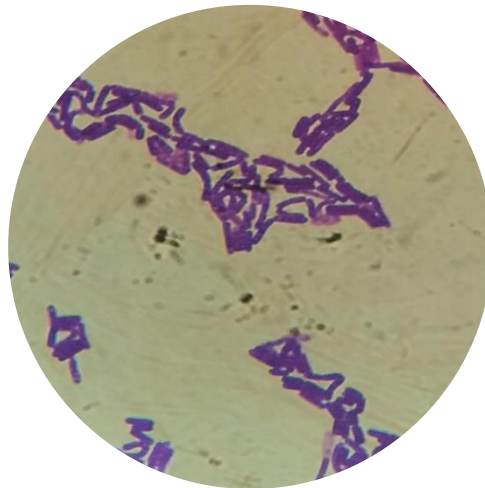
2.3. Bakteri *Bacillus* sp.

2.3.1. Habitat *Bacillus* sp.

Pada umumnya habitat bakteri *genus Bacillus* berada pada lingkungan terrestrial, akuatik (Shu and Yang, 2017), dan paling banyak ditemukan di tanah (Hatmanti, 2000). Beberapa spesies *Bacillus* mampu bertahan hidup di lingkungan ekstrem, seperti gurun, mata air panas, tanah Arktik, perairan tawar, dan sedimen laut (Turnbull, 2004).

2.3.2. Morfologi *Bacillus* sp.

Berdasarkan morfologi mikroskopik, *Bacillus* memiliki bentuk sel batang (*rod*) dan sifat Gram positif. Ukuran sel *Bacillus* berkisar $0,5-2,5 \mu\text{m} \times 1,2-10 \mu\text{m}$ dan sering berpasangan membentuk rantai dengan ujung bundar atau persegi (Napitupulu dkk., 2019). *Bacillus* termasuk bakteri yang mampu bergerak (motil) dengan adanya flagel tipe peritrikus. *Bacillus subtilis* dapat mensintesis sebanyak 20 tubuh basal flagella dan letaknya tidak acak pada permukaan sel, tersusun simetris di sekitar *midcell*, dan bukan pada kutub (Guttenplan *et al.*, 2013). Morfologi mikroskopik *Bacillus* spp. disajikan pada Gambar 4.

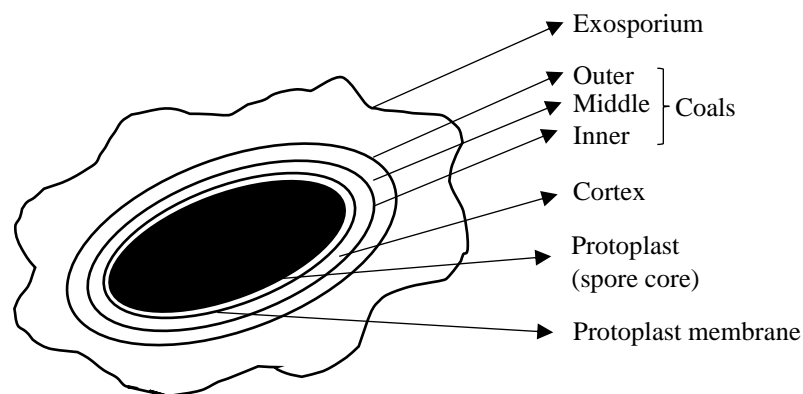


Gambar 4. Morfologi mikroskopik pengecatan Gram *Bacillus* spp. pada perbesaran $100\times$ (Royanti, 2022).

Seiring bertambahnya umur sel pada beberapa spesies *Bacillus*, sifat Gram akan berubah menjadi Gram negatif (Turnbull, 2004). Contoh spesies *Bacillus* yang telah dikarakterisasi sebagai Gram negatif yaitu *Bacillus azotoformans*, *Bacillus farraginis*, *Bacillus fordii*, *Bacillus fortis*, *Bacillus oleronius*, dan *Bacillus subterraneus* (Cote *et al.*, 2015).

Bacillus termasuk kelompok bakteri saprofit yang memiliki endospora dan berfungsi sebagai pertahanan sel, hal tersebut merupakan keunikan yang dimiliki

Bacillus sehingga mampu hidup pada berbagai kondisi lingkungan (Wiyada, 2012). Endospora merupakan struktur pada sel *Bacillus* yang letaknya di dalam sel, berfungsi mempertahankan sel dari berbagai kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan untuk pertumbuhannya. Bentuk endospora pada sel *Bacillus* dapat mempengaruhi suhu optimum pertumbuhan sel. Perbedaan endospora pada *Bacillus* dapat dipengaruhi oleh waktu inkubasi dan suhu lingkungan. Adanya perbedaan waktu inkubasi pada *Bacillus* antara 12 jam hingga 72 jam dapat menyebabkan efek yang besar pada populasi endospora (Shu and Yang, 2017). Struktur endospora pada *Bacillus* disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur endospora *Bacillus* sp. (Turnbull, 2004).

Struktur endospora *Bacillus* dari luar ke dalam meliputi: eksosporium; tiga lapisan pelindung (luar, tengah, dan dalam); korteks; membran protoplas; dan protoplas (inti spora). Secara umum setiap struktur tersebut memiliki peranan yaitu protoplas atau sel germinal berperan dalam membawa konstituen sel vegetatif keturunannya dan mengandung asam dipicolinic yang berfungsi untuk ketahanan terhadap panas pada spora, membran protoplas tergolong lapisan bagian dalam dapat berperan menjadi dinding sel vegetatif baru ketika spora berkecambah, korteks terdiri dari peptidoglikan yang penting dalam ketahanan panas dan radiasi, dan tiga lapisan pelindung yang menyusun hingga 50% volume spora dilindungi oleh bahan kimia, enzim, dan sebagainya (Turnbull, 2004).

Morfologi secara makroskopik pada koloni *Bacillus*, diketahui memiliki bentuk koloni yang berbeda-beda pada medium *Nutrient Agar*. Morfologi koloni pada *Bacillus* yang diisolasi dari tanah perkebunan teh Ngere, Kenya memiliki warna koloni yang cenderung putih hingga krem, elevasi koloni datar (*flat*) dan *filamentous* atau bercabang, dan permukaan halus hingga kasar (Wafula, *et al.*, 2014). Isolat *Bacillus* endofitik yang diisolasi dari tanaman kelapa sawit, menunjukkan morfologi koloni dengan warna keputihan, bentuk bulat, dan tepian rata (Puspita dkk., 2017).

Bentuk koloni *Bacillus* pada medium pertumbuhan dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Sebagai contoh, *B. subtilis* memiliki morfologi koloni yang beragam pada medium yang diberi perlakuan dengan variasi kondisi lingkungan, seperti pH, suhu, ketersediaan nutrisi, dan jenis medium pertumbuhan yang digunakan. Ketika konsentrasi oksigen tinggi, *B. subtilis* dapat melokalisasi sel yang tumbuh, kemudian membuat pelikel diantara cairan dan udara pada medium, dan terbentuk koloni yang berbeda. Pada permukaan medium padat, koloni *B. subtilis* memiliki ketebalan koloni hingga 1 mm, bentuk koloni *circular* dan ketika terdapat nutrisi yang relatif rendah bentuk koloni dapat dendritik, permukaan kasar dan tepian yang beragam, diameter koloni dapat mencapai 50 mm tergantung pada kondisi lingkungannya (Tasaki *et al.*, 2017). Salah satu contoh morfologi koloni *Bacillus* disajikan pada Gambar 6 berikut.



Gambar 6. Morfologi koloni *Bacillus amyloliquefaciens* berumur 24 jam yang ditumbuhkan pada media LB agar (Liu *et al.*, 2010).

2.3.3. Karakteristik Fisiologi dan Biokimia *Bacillus* sp.

Bacillus termasuk bakteri yang memiliki sifat aerobik atau anaerobik fakultatif, dikenal dengan ASB (*Aerobic Spore-Bearers*) (Turnbull, 2004). Secara umum *Bacillus* memiliki aktivitas fisiologi dan biokimia yang mendukung pertumbuhannya dan antarspesies *Bacillus* diketahui memiliki aktivitas fisiologi dan biokimia yang berbeda-beda. Menurut Bouali *et al.* (2016) *B. cereus* yang diisolasi dari tanah pada beberapa lokasi di Algeria memiliki karakteristik fisiologis, meliputi katalase positif atau mampu memproduksi enzim katalase yang akan menguraikan hidrogen peroksida menjadi H₂O, lektinase positif, dan hemolitik positif, serta isolat bakteri ini mampu tumbuh pada rentang suhu 15°C hingga 45°C. *B. cereus* asal tanah perkebunan teh Ngere, Kenya yang berhasil diisolasi oleh Wafula *et al.* (2014) menunjukkan karakteristik fisiologi, meliputi katalase positif, mampu mencairkan gelatin, sitrat positif, dan mampu untuk mereduksi nitrat menjadi nitrit, serta oksidase positif. Selain itu terdapat *B. subtilis* yang diisolasi dari tempat yang sama memiliki karakteristik fisiologi, meliputi katalase positif dan tidak dapat memproduksi gas hidrogen sulfida.

Rajashekhar *et al.* (2017) melaporkan bahwa *Bacillus subtilis* dan *Bacillus thuringiensis* positif pada uji katalase, nitrat, sitrat, dan fermentasi glukosa. Selain itu, mampu menunjukkan reaksi positif pada beberapa uji fermentasi karbohidrat lainnya, yaitu arginin, maltose, dekstrosa, hidrolisis esculin, dan teralosa, serta menunjukkan hasil yang negatif pada uji Voges-Proskauers, mannitol, dan arabinosa. *B. subtilis* juga mampu melakukan fermentasi sukrosa, sedangkan *B. thuringiensis* tidak dapat memfermentasikan sukrosa.

2.3.4. Klasifikasi *Bacillus* sp.

Bacillus sp. merupakan *genus* bakteri dari famili Bacillaceae, termasuk ke dalam filum Firmucutes, dan memiliki lebih dari 200 spesies yang telah teridentifikasi (Shu and Yang, 2017). Pada Oktober 2012 terdapat 260 spesies *Bacillus* yang

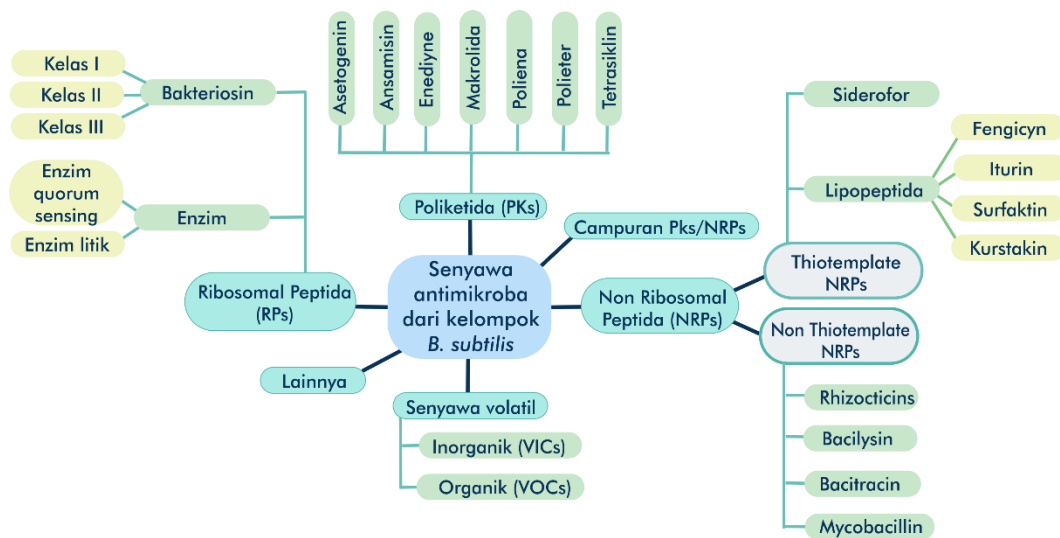
tercatat pada daftar nama prokariotik yang berada di dalam nomenklatur serta terdapat lebih dari 116 spesies yang tercantum dalam versi terbaru dari “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (Cote *et al.*, 2015). Berikut klasifikasi *Bacillus* spp. berdasarkan “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” Edisi ke-2 (2004).

Klasifikasi *Bacillus* spp.

Kerajaan : Bacteria
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Bacillales
Famili : Bacillaceae
Genus : *Bacillus*
Spesies : *Bacillus* spp.

2.3.5. Senyawa Antibakteri yang Dihasilkan oleh *Bacillus* sp.

Beberapa spesies *Bacillus* sp. mampu memproduksi senyawa metabolit sekunder berupa senyawa bioaktif yang bersifat sebagai antimikroba, termasuk antibakteri. Caulier *et al.* (2019) mengklasifikasikan senyawa antimikroba yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis* ke dalam beberapa kelompok berdasarkan jalur biosintesis dan sifat kimia yaitu: Ribosomal Peptida (RPs), senyawa volatil, Poliketida (PKs), Non-Ribosomal Peptida (NRPs), dan campuran antara PKs dan NRPs. Kebanyakan molekulnya tergolong senyawa antimikroba peptida (AMPs). Struktur molekul senyawa tersebut umumnya siklik, hidrofobik, dan terdapat gugus yang khas seperti D-asam amino atau ikatan thioeter intramolekul. Klasifikasi senyawa antimikroba dari *B. subtilis* berdasarkan jalur biosintesisnya disajikan pada Gambar 7. Deskripsi singkat terkait kelompok senyawa antibakteri yang diproduksi *Bacillus* berdasarkan jalur biosintesisnya disajikan pada Tabel 1.

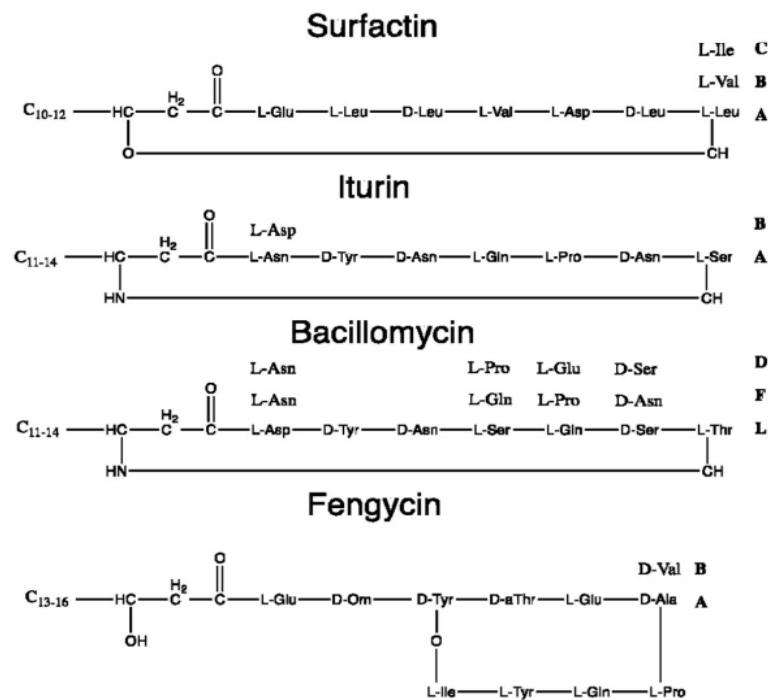


Gambar 7. Klasifikasi senyawa antimikroba dari *B. subtilis* berdasarkan jalur biosintesisnya (Caulier *et al.*, 2019).

Senyawa antibakteri dari *Bacillus* yang banyak dilaporkan mampu menghambat mikroba fitopatogen yaitu senyawa lipopeptida. Klasifikasi senyawa lipopeptida disajikan pada Tabel 2. Senyawa lipopeptida merupakan peptida amfifatik yang memiliki sisi oligopeptida hidrofilik dengan D atau L asam amino dan berikatan dengan sisi asam lemak hidrofobik. Terdapat empat famili lipopeptida (Tabel 2) yang dibedakan oleh susunan asam amino yang terikat dengan sisi oligopeptida (Barale *et al.*, 2022). Struktur beberapa senyawa lipopeptida dapat dilihat pada Gambar 8.

Peranan lipopeptida *Bacillus* telah diketahui sebagai surfaktan dalam menghambat mikroba fitopatogen dengan mekanisme aksi menargetkan membran plasma sel melalui aktivitas pembentukan pori (*pore forming mechanism*) menyebabkan kematian sel (Tran *et al.*, 2022). Lipopeptida surfactin diketahui memiliki kemampuan merusak membran sel bakteri dengan penetrasi melalui interaksi hidrofobik antara asam lemak dan rantai hidrokarbon pada fosfolipid membran yang mana dapat menyebabkan destabilisasi struktur membran. Mekanismenya diawali dengan perubahan konformasi bagian peptida siklik pada surfactin yang memfasilitasi integrasi ke membran sel, mengakibatkan perubahan struktur

membran. Struktur membran yang berubah menghasilkan dehidrasi pada gugus polar kepala lipid juga perubahan konstituen lipid. Hal tersebut menyebabkan pembentukan misel dari fosfolipid dan terjadi pembentukan pori pada membran bilayer sehingga permeabilitas membran terganggu dan terjadi kebocoran isi sel (Dimkic *et al.*, 2022; Fira *et al.*, 2018).



Gambar 8. Struktur senyawa lipopeptida *B. subtilis* (Caulier *et al.*, 2019).

Beberapa studi menuliskan bahwa kemampuan lipopeptida dapat sebagai antifungi dan antibakteri untuk menanggulangi penyakit pada tanaman. *B. subtilis* yang diisolasi dari tanah Kebun Botani, Yeshwant Mahavidyalaya, Nanded, India mampu menghasilkan antibakteri lipopeptida kelompok iturin, meliputi mycosubtilin dan iturin A bersifat antifungi terhadap *A. flavus*, *C. tropicalis*, dan *C. parapsilosis* (Shinde *et al.*, 2015). Aktivitas antibakteri *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 dan ekstrak kasar lipopeptida mampu menekan keparahan penyakit bercak daun pada tanaman bit yang diakibatkan oleh infeksi bakteri *P. syringae* (Nicolic *et al.*, 2018).

Tabel 1. Senyawa antibakteri dari *Bacillus* berdasarkan jalur biosintesisnya
(Caulier *et al.*, 2019)

Jalur Biosintesis	Proses Biosintesis	Klasifikasi Senyawa	Keterangan	Mekanisme Aksi
Ribosomal Peptida (RPs)	Sintesis dari turunan prekursor pendek, membentuk senyawa lengkap selama modifikasi post translasi	Bakteriosin Kelas I	AMPs kecil 19-22 AA, struktur umum lantibiotik	Menghambat sintesis dinding sel berikatan pada lipid II, perubahan protoplasma, pembentukan pori atau disintegrasi sel. Bersifat bakterisidal menargetkan selubung sel.
		Bakteriosin Kelas II	peptida kecil (<10 kDa), struktur linier dan tidak dimodifikasi	
		Bakteriosin Kelas III	molekul yang besar dan labil terhadap panas	
Poliketida (PKs)	Berasal dari prekursor asil CoA. Terdapat 3 modul: modul elongasi; modul inisiasi dengan domain asiltransferase (AT) dan domain <i>Acyl Carrier Protein</i> (ACP); dan modul terminasi.	Famili poliena: 1. Bacillaene 2. Difficidin 3. Macrolatin	PKs tipe I tersusun secara linier dan terikat kovalen.	Menghambat sintesis protein.
Non Ribosomal Peptida (NRPs)	Penambahan residu asam amino secara berurutan melalui 3 modul: inisiasi dengan domain adenilasi tiolasi, dan kondensasi; terminasi dengan domain tioesterase; dan elongasi dengan domain <i>cyclization</i> (Cy), <i>epimerization</i> (E), dan metilasi (M).	Tiotemplate NRPs atau lipopeptida: 1. surfactin, 2. iturin, 3. fengisin, 4. kurstakin	linier hingga siklik bercabang	Gangguan membran plasma.
		Non Tiotemplate NRPs: 1. bacilysin 2. chlorotetain 3. bacitracin	linier hingga siklik bercabang	Menghambat sintesis glukosamin menyebabkan lisis sel dengan pelepasan anticapsin dan menghambat biosintesis peptidoglikan bakteri (Parray and Shameem, 2020).

Tabel 2. Klasifikasi senyawa lipopeptida yang dihasilkan kelompok *Bacillus* (Caulier *et al.*, 2019).

Kelompok Senyawa	Struktur	Tipe dan panjang asam lemak	Panjang ikatan peptida
Iturin	Siklik peptida	B-amino 14-17 karbon	Heptapeptida
Surfactin	Siklik lakton	β -hidroksi 13-15 karbon	Heptapeptida
Fengycin	Siklik lakton	β -hidroksi 16-19 karbon	Dekapeptida
Kurstakin	Siklik lakton	β -hidroksi 11-14 karbon	Heptapeptida

2.4. Antibakteri

2.4.1. Penggolongan Antibakteri

Menurut Shiel (2021), antibakteri adalah segala sesuatu yang dapat menghancurkan bakteri atau menekan pertumbuhan dan kemampuan bakteri untuk bereproduksi. Antibakteri yang merupakan subkelas dari antibiotik dapat diklasifikasikan ke dalam beberapa kelompok. Secara umum antibakteri dapat diklasifikasikan berdasarkan tipe mekanisme aksi yaitu bakteriostatik dan bakteriosidal (Ullah *and* Ali, 2017). Bakteriostatik memberikan efek mencegah atau menghambat pertumbuhan sel bakteri, sedangkan bakteriosidal memberikan efek membunuh sel bakteri (Calhoun *et al.*, 2020).

Antibakteri dapat diklasifikasikan berdasarkan struktur kimianya. Menurut Etebu *and* Arikekpar (2016) dan Ullah *and* Ali (2017) klasifikasi antibakteri disajikan pada Tabel 3 berikut.

Tabel 3. Klasifikasi antibakteri berdasarkan struktur kimia (Etebu *and* Arikekpar, 2016; Ullah *and* Ali, 2017)

Kelas antibakteri: contoh	Struktur	Mekanisme aksi
Beta-Laktam: Turunan penicillin, <i>cephalosporins</i> , <i>monobactams</i> , dan carbepenems	Cincin 3-karbon dan 1-nitrogen	Mengganggu sintesis dinding sel bakteri
Makrolida: <i>Erythromycin</i> , <i>roxithromycin</i> , <i>clarithromycin</i> , <i>azithromycin</i> , dan <i>dirithromycin</i>	14 hingga 16 cincin laktosa monosiklik terdapat gula L-cladinose dan D-desosamine	Menghambat sintesis protein bakteri, mengikat ribosom dan mencegah penambahan asam amino ke rantai polipeptida selama sintesis protein
Tetrasiklin: <i>oxytetracycline</i> dan <i>doxycycline</i> .	Empat cincin hidrokarbon	Menargetkan ribosom, mengganggu penambahan asam amino ke rantai polipeptida selama sintesis protein
Kuinolin: <i>lomefloxacin</i> , <i>ofloxacin</i> , <i>norfloxacin</i> , atifloxacin, <i>ciprofloxacin</i> , <i>moxifloxacin</i> , <i>levofloxacin</i> , gemifloxacin, dan <i>sparfloxacin</i>	Senyawa asam nalidixic	Mengganggu replikasi DNA dan transkripsi pada bakteri
Aminoglikosida: Gentamicin, <i>tobramycin</i> , <i>streptomycin</i> , dan <i>kanamycin</i>	Gula 3-amino yang dihubungkan oleh ikatan glikosidik	Menghambat sintesis protein bakteri dengan mengikat salah satu subunit ribosom
Sulfonamida: <i>Sulfadiazine</i>	Cincin benzen yang mengikat gugus sulfonamida dan gugus amina	Menghambat kemampuan bakteri dalam membuat asam folat yang dibutuhkan dalam membuat DNA dan protein
Glikopeptida: <i>sisiomicin</i> , <i>netilmicin</i> , <i>amikacin</i> , <i>neomycin</i> , <i>tobramycin</i> , <i>toframycin</i> , <i>spectinolyacin</i> , dan <i>paromonucin</i> .	Peptida siklik dari tujuh asam amino yang terikat dengan dua gula	Mengikat target melalui pembentukan 5 ikatan hidrogen dengan rantai utama peptida pada obat
Oksazolidinon: <i>Linezolid</i>	Mengandung 2-oksazolidon (heterosiklik terdapat nitrogen dan oksigen pada cincin 5)	Menghambat sintesis protein dengan mengikat sisi P dari subunit ribosom 50S

Antibakteri berdasarkan fungsinya di dalam obat dapat dibagi menjadi empat kelompok yaitu: inhibitor sintesis dinding sel, inhibitor fungsi membran, inhibitor sintesis protein, dan inhibitor sintesis asam nukleat. Mekanisme antibakteri sebagai inhibitor sintesis dinding sel, misalnya pada obat atau antibiotik β -laktam

diawali dengan pengikatan molekul obat tersebut ke reseptor sel yaitu protein pengikat penisilin atau *penicillin binding proteins* (PBPs) kemudian bertindak sebagai molekul palsu terhadap protein D-alanil-D-alanin karboksipeptidase (DD-CPase) sehingga terjadi penghambatan reaksi transpeptidase dan sintesis peptidoglikan (Ullah *and* Ali, 2017). DD-CPase adalah enzim yang mengkatalisis polimerasi rantai glikan yang terdiri dari N-asetilglukosamin (NAG) dan asam N-asetilmuramat (NAM) pada peptidoglikan (Rioseras *et al.*, 2016). Antibakteri sebagai inhibitor fungsi membran, misalnya pada antibiotik polimiksin secara mekanis berasosiasi dengan substrat lipopolisakarida pada membran luar bakteri Gram negatif. Struktur membran luar berubah sehingga permeabilitas meningkat yang berakibat terganggunya keseimbangan osmotik. Antibakteri sebagai inhibitor sintesis protein bekerja pada setiap tahapan sintesis protein seperti tahap inisiasi dan elongasi. Misalnya antibiotik tetrasiklin dapat mengikat subunit ribosomal 30S, translasi protein akan terganggu melalui penghambatan tRNA aminoasil yang mengikat ribosom. Antibakteri dalam sintesis asam nukleat salah satunya dapat berperan sebagai inhibitor proses replikasi DNA melalui ikatan molekul antibakteri dengan enzim DNA *gyrase* mengakibatkan kerusakan sel (Ullah *and* Ali, 2017).

2.4.2. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Antibakteri

Menurut Li *et al.* (2017) keefektifan kerja antibakteri dipengaruhi oleh tiga faktor utama meliputi: (1) status bakteri (rentan dan resisten, toleran, persisten, biofilm) dan ukuran inokulum; (2) konsentrasi antibakteri; dan (3) faktor *host*.

(1) Status bakteri dan ukuran inokulum

Setiap bakteri memiliki sifat yang berbeda dalam menerima senyawa antibakteri diantaranya rentan, resisten, toleran, atau persisten. Sifat bakteri yang rentan dan resisten dapat ditentukan oleh Kadar Hambat Minimum (KHM) dari antibakteri yang diujikan. Toleran merupakan kemampuan bakteri untuk tetap hidup ketika

menerima antibakteri dalam waktu yang singkat, hal tersebut hanya digunakan untuk menguji antibakteri bakterisidal. Persisten terjadi pada subpopulasi bakteri (<1%) yang tidak terbunuh oleh antibakteri. Resistensi antimikroba dapat muncul di dalam biofilm, densitas sel yang tinggi dapat meningkatkan jumlah mutan yang resisten yang dapat dipilih dibawah tekanan antibakteri dan DNA ekstraseluler di dalam matriks biofilm dapat memfasilitasi transfer gen horizontal dari faktor resisten.

Ukuran inokulum bakteri dapat mempengaruhi nilai KHM. Nilai KHM meningkat seiring dengan bertambahnya jumlah inokulum bakteri. Jika terdapat pengaruh inokulum, bakteri bisa menjadi rentan ketika inokulum sesuai standar (10^5 CFU/ml) namun dapat resisten ketika jumlah inokulum bertambah. Jumlah inokulum yang tinggi dapat menurunkan aktivitas antibakteri, hal tersebut didasari oleh kemampuan inokulum yang mungkin menurunkan perbandingan molekul obat yang tersedia untuk setiap target karena adanya penurunan konsentrasi antibakteri.

(2) Konsentrasi antibakteri

Perbedaan konsentrasi antibakteri dapat menghasilkan seleksi yang berbeda pada bakteri resisten dan berpengaruh pada keefektifan kerja antibakteri. Aktivitas antibakteri dapat berbeda-beda pada setiap bakteri uji, mengartikan bahwa spektrum kerja antibakteri tergantung pada jumlah komponen aktif yang terekstrak atau terdapat pada antibakteri yang berpengaruh pada konsentrasi antibakteri. Konsentrasi dan jenis antibakteri dapat mempengaruhi difusi antibakteri pada media. Adanya perbedaan konsentrasi dan jenis antibakteri dapat menghasilkan perbedaan hasil terhadap bakteri uji (Lestari dkk., 2016).

(3) Faktor *host*

Antibakteri dapat menginduksi perubahan mikrobiota pada *host* yang dapat mempengaruhi ketahanan homeositas dasar.

Aktivitas antibakteri juga dapat dipengaruhi oleh kandungan senyawa metabolit dan daya difusi sampel atau obat yang diujikan terhadap bakteri uji, serta jenis bakteri patogen yang dihambat (Lestari dkk., 2016).

2.5. Produksi Senyawa Antibakteri

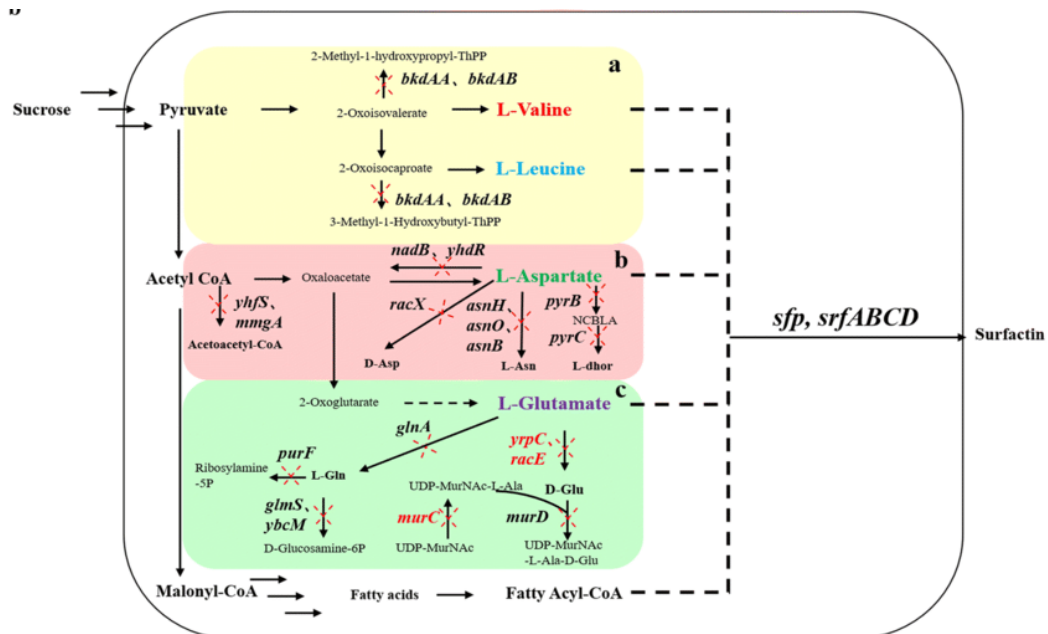
Bacillus sp. mampu memproduksi senyawa antibakteri sebagai metabolit sekunder dikendalikan oleh susunan genetik yang terekspresikan penuh dan didukung oleh kemampuan sel bakteri untuk tumbuh pada medium atau substrat tertentu (Ponmurugan and Nithya, 2008). Selain itu, sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor abiotik meliputi: sumber karbon dan nitrogen yang spesifik, unsur mikro, pH, suhu, dan oksigen (Barale *et al.*, 2022; Usta and Demirkan, 2013; Sun *et al.*, 2019).

Sumber karbon dan nitrogen dapat digunakan sebagai bahan dasar untuk membentuk senyawa prekursor dan dapat masuk ke dalam jalur biosintesis senyawa antibakteri. Misalnya, senyawa dari famili poliketida disintesis melalui kondensasi turunan asetil Co-A yaitu malonil Co-A. Peningkatan malonil Co-A sebagai prekursor dan glukosa-1-fosfat dapat meningkatkan produksi senyawa poliketida tersebut. Sehingga dapat diketahui bahwa ketersediaan senyawa prekursor yang dibentuk dapat mempengaruhi jumlah dan jenis senyawa antibakteri yang dihasilkan (Zabala *et al.*, 2016).

Salah satu jenis senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. terhadap patogen tanaman yaitu senyawa lipopeptida (Fira *et al.*, 2018); Dimkic *et al.*, 2017). Berdasarkan sumber karbon dan nitrogennya, Jacques (2011) menerangkan bahwa produksi senyawa lipopeptida golongan surfactin diketahui lebih efektif menggunakan sumber karbon berupa glukosa dan sumber nitrogen berupa asam glutamat. Glukosa diubah menjadi piruvat melalui proses glikolisis, kemudian piruvat membentuk asetil Co-A dan menghasilkan senyawa-senyawa prekursor untuk sintesis asam-asam amino penyusun lipopeptida. Asam glutamat sebagai

sumber nitrogen digunakan untuk pembentukan asam amino dan protein, glutamat dapat diubah menjadi glutamin yang berperan sebagai asam amino atau bahan penyusun (*building block*) pada enzim *Non-ribosomal Peptide Synthase* (NRPS) yang berperan dalam biosintesis antimikroba (Walker *and* van der Donk, 2016).

Sebagai contoh, glutamat turunan dari prekursor *2-oxoglutarate* digunakan sebagai salah satu prekursor asam amino untuk membentuk senyawa antibakteri surfactin pada *B. subtilis*. Biosintesis surfactin diketahui dibagi menjadi tiga bagian, yaitu biosintesis asam lemak dari *fatty acyl-CoA*, biosintesis keempat asam amino dari piruvat dan turunannya yaitu asetil Co-A, dan penggabungan surfactin. Skema biosintesis surfactin disajikan pada Gambar 9 berikut (Wang *et al.*, 2019).



Gambar 9. Skema biosintesis surfactin pada *B. subtilis* (Wang *et al.*, 2019).

Unsur mikro berupa garam dan mineral seperti Mg^{2+} , Mn^{2+} , dan Ca^{2+} diperlukan bakteri sebagai aktivator enzim dan akseptor elektron dalam metabolisme glukosa (Malaka dkk., 2013). Produksi antibakteri banyak dihasilkan pada kisaran pH 6,0-7,5 atau cenderung netral (Usta *and* Demirkan, 2013). Pengaruh pH tersebut terkait dengan pertumbuhan *Bacillus* yang termasuk bakteri neutrofilik dengan pH

optimum pertumbuhan berkisar pada pH 7-8 (Yani dkk., 2019). Selain itu, *Bacillus* sp. dapat memproduksi senyawa antibakteri secara optimum pada suhu optimum pertumbuhannya yaitu pada 30°C-37°C (Meena *et al.*, 2018). Lebih lanjut, diketahui bahwa *B. subtilis* RB14 yang diisolasi dari tanah kompos mampu memproduksi senyawa antibakteri surfactin pada suhu 37°C (Jacques, 2011). Pengaruh oksigen pada produksi senyawa antibakteri terkait dengan kondisi inkubasi secara aerobik ataupun anaerobik. Berdasarkan kebutuhan oksigennya, *Bacillus* tergolong bakteri anaerobik fakultatif yang dapat tumbuh pada kondisi anaerobik maupun aerobik (Turnbull, 2004). Sun *et al.* (2019) melaporkan bahwa inkubasi secara aerobik dengan peningkatan kecepatan penggojlokkan (*shaking*) dapat mempengaruhi produksi antibakteri. Strain *Bacillus natto* NT6 yang dikulturkan pada Landy *medium* dengan inkubasi pada kecepatan *shaker* lebih dari 160 rpm dapat meningkatkan produksi surfactin secara signifikan.

2.6. Ekstraksi Senyawa Antibakteri

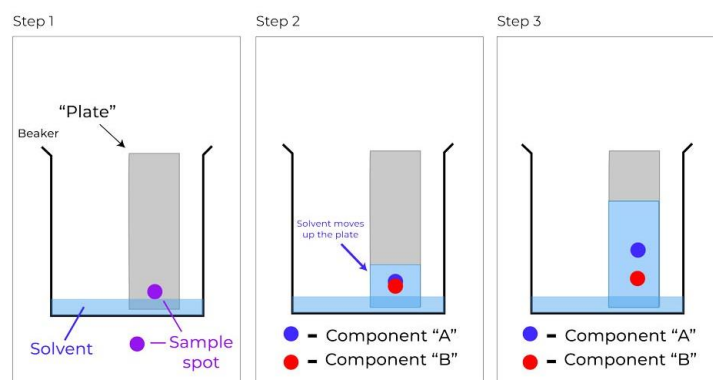
Ekstraksi adalah proses pemisahan senyawa dari campurannya menggunakan pelarut yang sesuai (Mukhriani, 2014). Senyawa antibakteri didapatkan dengan cara ekstraksi secara partisi atau ekstraksi cair-cair dengan pelarut. Tujuan ekstraksi secara partisi yaitu untuk memisahkan senyawa metabolit sekunder yang terdapat di dalam ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya dengan prinsip pemisahan berdasarkan distribusi zat pada dua larutan yang tidak bercampur (Khoiriyah dkk., 2014). Partisi dilakukan dengan cara pengocokan. Prinsipnya terkait dengan perbedaan polaritas dan bobot antara dua fraksi (Pratiwi dkk., 2016). Salah satu pelarut yang dapat digunakan untuk partisi yaitu etil asetat. Pelarut etil asetat berperan dalam menarik senyawa antibakteri dari campuran yang terdapat di fraksi air. Menurut penelitian Dimkic *et al.* (2017) berdasarkan analisis spektrum massa, ekstrak etil asetat senyawa antibakteri menunjukkan intensitas relatif puncak yang tinggi sehingga dapat diketahui bahwa metode ekstraksi dengan pelarut etil asetat memiliki hasil yang lebih baik dan kelimpahan senyawa antibakteri yang tinggi.

2.7. Identifikasi dan Pemisahan Senyawa Antibakteri

Identifikasi awal senyawa antibakteri melalui Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan pemisahan senyawa antibakteri dari campurannya melalui kromatografi kolom terbuka.

2.7.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan kromatografi yang memisahkan campuran senyawa berdasarkan perbedaan adsorpsi dan daya partisi serta kelarutan dari senyawa yang bergerak mengikuti kepolaran eluen. Fase gerak berupa pelarut tunggal atau campuran dua hingga empat pelarut murni di dalam bejana. Fase diam berupa adsorben padat pada pelat kaca, alumunium, atau plastik (Wulandari, 2011). Proses pemisahan senyawa dengan KLT terdapat pada Gambar 10.



Gambar 10. Pemisahan senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis (Reddy, 2018).

Pembacaan hasil KLT sebagai identifikasi awal senyawa dapat dilihat dari adanya pembentukan warna yang terlihat di bawah sinar UV 254 nm dan dapat direaksikan dengan reagen tertentu, misalnya serum sulfat sebagai reagen yang

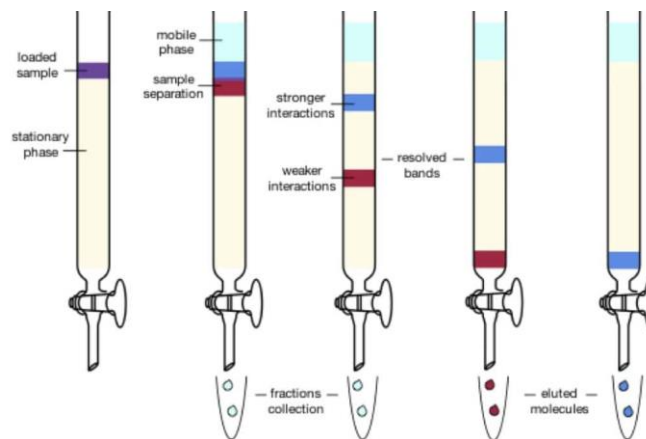
umum untuk menentukan keberadaan senyawa organik dengan perubahan warna menjadi coklat. *Retardation factor* (Rf) atau faktor retardasi sebagai deskripsi molekul secara kualitatif (Coskun, 2016) merupakan parameter yang menggambarkan migrasi senyawa dan menyatakan posisi noda pada fase diam setelah dielusi dalam KLT. Faktor-faktor yang mempengaruhi nilai Rf meliputi dimensi dan jenis ruang, sifat dan ukuran lempeng, arah aliran fase gerak, volume dan komposisi fase gerak, kondisi kesetimbangan, kelembaban, dan metode persiapan sampel KLT sebelumnya. Nilai Rf berkisar antara 0 hingga 1, nilai Rf terbaik untuk deteksi UV berkisar antara 0,2-0,8 dan nilai Rf terbaik untuk deteksi secara visual berkisar antara 0,2-0,9. Nilai Rf yang kurang dari 0,2 menandakan belum terjadi kesetimbangan antara komponen senyawa dengan fase diam dan fase gerak (Wulandari, 2011). Nilai Rf dapat didefinisikan sebagai berikut (Nurdiani, 2018).

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakan oleh senyawa}}{\text{Jarak yang digerakan oleh pelarut}}$$

2.7.2. Kromatografi Kolom Terbuka

Kromatografi kolom terbuka merupakan kromatografi kolom yang pengaliran pelarutnya dengan gaya gravitasi. Fase diam kromatografi kolom berupa adsorben atau substrat padat yang tidak larut dalam fase cair dapat berupa silika gel atau alumina dan fase geraknya berupa cairan atau pelarut yang bergerak mengalir membawa komponen dari campuran sepanjang kolom. Prinsip dasar kromatografi ini yaitu komponen-komponen dalam sampel harus memiliki afinitas yang berbeda terhadap adsorben dalam kolom sehingga campuran yang diuji kemudian dilarutkan dalam sedikit pelarut melalui puncak kolom dan dibiarkan mengalir ke dalam zat penyerap. Senyawa yang lebih polar akan terserap dengan kuat sehingga akan turun lebih lambat dibandingkan senyawa non polar. Komponen-komponen senyawa yang diserap sempurna oleh adsorben akan membentuk pita-pita pada kolom. Pita-pita tersebut masing-masing berisi satu macam komponen (Nurdiani, 2018). Proses elusi pada kolom akan memisahkan

komponen secara individu, terdapat dua teknik yaitu elusi isokratik menggunakan komposisi jenis atau polaritas pelarut yang sama selama proses pemisahan dan elusi gradien menggunakan pelarut dengan polaritas tinggi secara bertahap atau pelarut dengan kekuatan elusi tinggi selama proses pemisahan (Aryal, 2018).



Gambar 11. Pemisahan senyawa dengan kromatografi kolom terbuka (Torres, 2016).

2.8. Uji Aktivitas Antibakteri

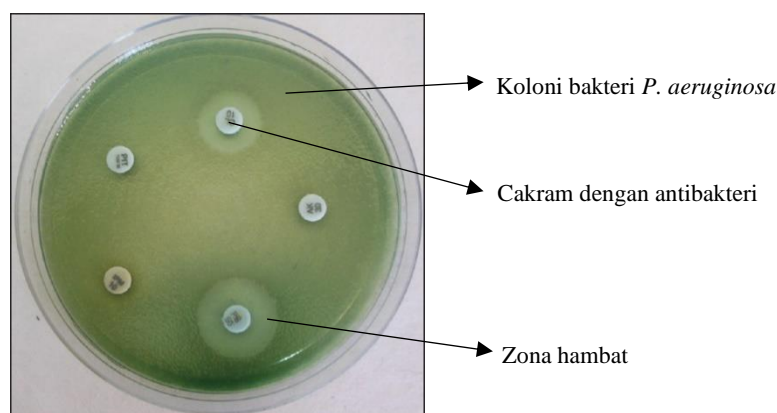
Uji aktivitas antibakteri atau agen antimikroba secara umum yang paling banyak diketahui dan mendasar yaitu metode difusi dan dilusi. Pada penelitian ini uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi agar cakram dan penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) menggunakan metode mikrodilusi cair.

2.8.1. Difusi Agar Cakram (*Agar Disk-Diffusion Method*)

Metode difusi agar dengan cakram dikembangkan pada tahun 1940. Metode ini banyak digunakan di laboratorium mikrobiologi klinis untuk pengujian kerentanan antimikroba (Balouiri *et al.*, 2016). Metode difusi cakram atau disebut

metode Kirby-bauer merupakan metode yang direkomendasikan oleh pedoman *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) sebagai metode yang umum untuk uji kerentanan antibakteri (Vineetha *et al.*, 2015). Prinsip dari metode ini adalah agen antimikroba berdifusi ke dalam agar, menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji, terdapat zona hambat di sekitar cakram, dan diukur zona hambat tersebut (Balouiri *et al.*, 2016). Mikroorganisme uji dapat dikatakan sensitif atau resisten terhadap antibakteri bergantung pada diameter zona hambat (Vineetha *et al.*, 2015).

Kondisi standar untuk metode ini yang disyaratkan oleh standar CLSI dengan mikroorganisme uji berupa bakteri yaitu media kultur menggunakan media *Mueller Hinton Agar* (MHA); ukuran inokulum $(1-2) \times 10^8$ CFU/ml standar *McFarland* 0,5; suhu inkubasi 35-37°C; dan waktu inkubasi 16-18 jam. (Balouiri *et al.*, 2016). Uji aktivitas antibakteri metode difusi agar dengan cakram disajikan pada Gambar 12.



Gambar 12. Metode Kirby-bauer pada uji aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* sesuai standar CLSI (Bhatt *et al.*, 2015).

2.8.2. Mikro Dilusi Cair (*Broth Micro Dilution*)

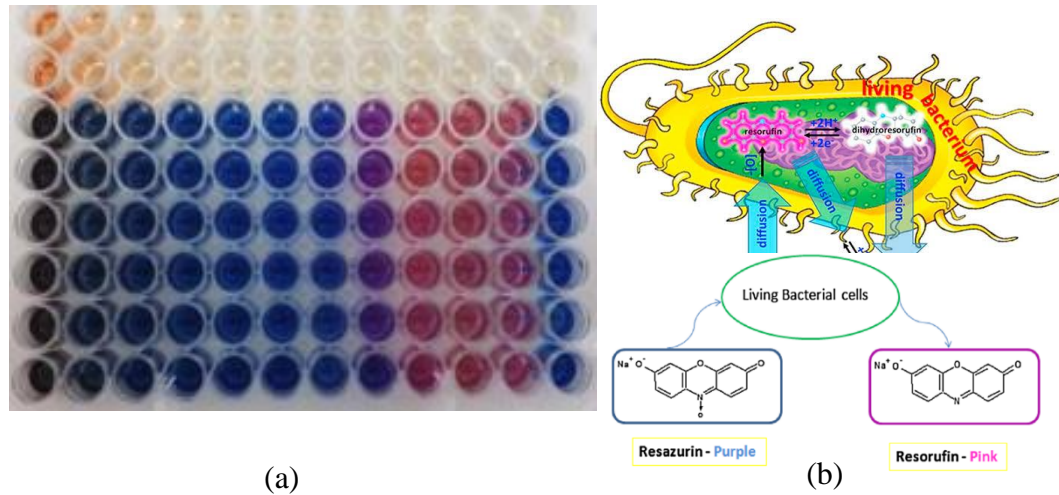
Metode dilusi merupakan metode pengujian kualitatif untuk menentukan nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) atau jumlah minimum yang diperlukan agen

antimikroba untuk menghambat bakteri (Vineetha *et al.*, 2015). Metode dilusi yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode dilusi cair (*broth dilution method*) secara mikro (*broth micro-dilution*). Agen antimikroba diencerkan sebanyak dua kali lipat dalam media pertumbuhan cair. Mikrodilusi dilakukan pengenceran dengan volume yang lebih kecil ($\mu\text{g/ml}$) menggunakan 96 sumur pelat mikrotiter. Setiap sumur diinokulasi dengan inokulum mikroba uji yang telah diencerkan (5×10^5 CFU/ml) dari inokulum standar *McFarland* 0,5 (1×10^8 CFU/ml) (Krochmal *and* Wicher, 2021). Menurut standar CLSI, kondisi yang sesuai untuk metode dilusi cair dengan mikroba uji berupa bakteri yaitu media kultur menggunakan media *Mueller Hinton Broth* (MHB); ukuran inokulum 5×10^5 CFU/ml; suhu inkubasi 35-37°C; dan waktu inkubasi selama 20 jam.

Pembacaan hasil KHM dari mikrodilusi dapat menggunakan perangkat berkemampuan tinggi berdasarkan nilai turbiditas atau kekeruhan pada panjang gelombang 600 nm untuk membedakan pertumbuhan di sumur mikrotiter. Semakin kecil nilai turbiditas maka kekeruhan semakin rendah menandakan pertumbuhan bakteri semakin sedikit. Nilai turbiditas yang kecil memberikan hasil bahwa ekstrak atau antibakteri yang diujikan mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Selain itu, pembacaan hasil KHM dapat menggunakan reagen pewarna seperti garam tetrazolium, MTT, XTT, dan pewarna resazurin (Balouiri *et al.*, 2016).

Penentuan KHM melalui mikro dilusi cair dengan pewarna resazurin disajikan pada Gambar 12. Resazurin digunakan sebagai indikator sel bakteri hidup berdasarkan perubahan warna. Nilai KHM dilihat pada pengenceran konsentrasi terkecil yang tidak menunjukkan perubahan warna resazurin. Sel bakteri yang hidup mampu melakukan reduksi pada resazurin yang semula berwarna biru tidak berpendar menjadi resofurin berwarna merah muda berpendar (Elshikh *et al.*, 2016). Chen *et al.* (2017) melaporkan bahwa resazurin tidak dapat direduksi oleh metabolit ekstraseluler di dalam media, reduksinya terjadi di permukaan sel. Resofurin yang dihasilkan akan memiliki dua tujuan akhir yaitu berdifusi ke dalam media dan direduksi oleh metabolit ekstraseluler, kemudian tujuan lainnya berdifusi ke dalam sel direduksi oleh metabolit intraseluler dan menghasilkan

dihidrosesofurin yang akan berdifusi ke luar sel atau media. Reduksi resazurin menjadi resosofurin disajikan pada Gambar 13.



Gambar 13.(a) penentuan KHM dengan pewarnaan resazurin pada mikrodilusi dengan pelat mikro 96 lubang (Elshikh *et al.*, 2016); (b) reduksi resazurin menjadi resosofurin pada sel bakteri hidup (Chen *et al.*, 2017; Elshikh *et al.*, 2016).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Maret 2021 sampai dengan Februari 2022 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT) Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri diameter 9 cm, pelat mikro 96 lubang, *Erlenmeyer* 250 ml dan 1000 ml, jarum ose bulat, bunsen, pipet mikro p1000 dan p100, mikrotip 1000 μ l dan 100 μ l, pipet tetes, *microtube* 1 ml, *beaker glass*, gelas ukur 250 ml dan 5 ml, botol vial 5 ml, tabung sentrifus 50 ml, bejana (*chamber*) bertutup untuk Kromatografi Lapis Tipis (KLT), pipa kapiler hematokrit, kolom (*columns*) kaca panjang 12 cm, corong pisah 250 ml, statif dan klem, *sprayer*, pinset, indikator pH universal, *Wickerham card*, larutan *McFarland* 0,5, *hot plate* dan *magnetic stirrer*, inkubator, kulkas, oven, autoklaf, *laminar air flow*, neraca digital, *centrifuge*, *rotary evaporator*, *plate reader*, dan penggaris 30 cm.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: isolat *Bacillus* sp. TSR 6 asal tanah KRL yang berdasarkan penelitian pendahuluan telah menunjukkan hasil skrining terbaik pada uji antagonis terhadap bakteri *Dickeya* sp., isolat murni *Dickeya* sp. sebagai bakteri patogen uji, media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), kertas cakram, *cotton buds*, akuades, alkohol 70%, kapas, spiritus, larutan NaCl 0,85%, lempeng KLT silika gel 60 F254, etil asetat (EtOAc), metanol (MeOH), DMSO 20%, N-Heksana (N-Heks), isopropil alkohol (IPA), etanol (EtOH), silika gel, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), media *Mueller Hinton Broth* (MHB), kloramfenikol 250 mg, pewarna resazurin, asam glutamat, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dan glukosa.

3.3. Metode

Penelitian ini tergolong dalam deskriptif kualitatif. Isolat yang digunakan adalah *Bacillus* sp. TSR 6. Sebelumnya, isolat tersebut telah diketahui memiliki zona hambat terhadap *Dickeya* sp. Isolat *Bacillus* sp. TSR 6 dikulturkan ke dalam media produksi antibakteri cair dengan inkubasi selama 5 hari, kemudian disentrifugasi menghasilkan supernatan yang diambil untuk ekstraksi senyawa antibakteri.

Ekstrak kasar didapatkan dengan metode partisi menggunakan pelarut EtOAc. Senyawa antibakteri yang didapatkan dari isolat *Bacillus* sp. TSR 6 diidentifikasi polaritasnya dan dilakukan karakterisasi awal senyawanya melalui analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan fasa gerak N-Heks:EtOAc (7:3) dan visualisasi di bawah UV 254 nm serta reaksi dengan serum sulfat. Ekstrak kasar dilakukan skrining awal aktivitas antibakteri terhadap *Dickeya* sp. dengan difusi agar cakram mengacu pada metode Balouiri *et al.* (2016).

Hasil skrining awal ekstrak kasar yang menunjukkan aktivitas antibakteri kemudian dilanjutkan dengan pemisahan senyawa melalui metode kromatografi kolom terbuka menggunakan elusi gradien dan fase diam silika gel 60. Kandidat senyawa antibakteri dari hasil kromatografi kolom tersebut kemudian diuji aktivitas antibakterinya terhadap *Dickeya* sp. melalui difusi agar cakram untuk mengetahui fraksi yang aktif menghasilkan zona hambat pada konsentrasi stok 5000 µg/ml dengan tiga ulangan serta kontrol positif (kloramfenikol) dan kontrol negatif (MeOH).

Selanjutnya, fraksi aktif dianalisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan eluen N-Heks:IPA (7:3) untuk identifikasi komponen senyawa dan reaksi dengan reagen serum sulfat dan ninhidrin, kemudian dilakukan penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) melalui mikrodilusi cair berdasarkan metode Elshikh *et al.* (2016) menggunakan pelat mikro 96 lubang dan pengukuran turbiditas pada λ 600 nm serta pewarnaan resazurin untuk mengetahui KHM masing-masing fraksi dalam menghambat *Dickeya* sp.

Data yang diperoleh dari setiap senyawa antibakteri yang diujikan terhadap *Dickeya* sp. dianalisis secara deskriptif dengan melihat interpretasi kategori daya hambat, perbandingan ukuran zona hambat, dan nilai KHM serta turbiditas. Hasil analisis disajikan dalam bentuk gambar, grafik, dan tabel.

3.4. Pelaksanaan

3.4.1. Produksi Senyawa Antibakteri *Bacillus* sp. TSR 6

Bacillus sp. berumur 24 jam diinokulasikan sebanyak 2 ose pada 50 ml media NB dan diinkubasi selama 24 jam di dalam *shaker* inkubator dengan kecepatan 120 rpm. Setelah waktu inkubasi tercapai, 50 ml inokulum tersebut diinokulasikan ke dalam 300 ml media produksi antibakteri cair dengan komposisi yaitu (g/L): asam glutamat 5 g;

KH_2PO_4 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,015 g; glukosa 10 g; dan pH 7. Pembuatan inokulum dan produksi antibakteri dibuat sebanyak tiga ulangan untuk skala produksi sebanyak 1 liter, kemudian diinkubasi selama 5 hari dengan *shaker* kecepatan 120 rpm.

Proses pemanenan senyawa antibakteri dilakukan dengan sentrifugasi untuk memisahkan supernatan dan biomassa sel. Kultur dibagi sebanyak 25 ml ke dalam tabung sentrifus steril berukuran 50 ml untuk disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan diambil dan dievaporasi dengan *rotary evaporator* sehingga menghasilkan fraksi air yang lebih pekat untuk diekstraksi.

3.4.2. Ekstraksi Senyawa Antibakteri *Bacillus* sp. TSR 6

Proses ekstraksi senyawa kandidat antibakteri dilakukan dengan cara ekstraksi cair-cair atau partisi. Proses partisi diawali dengan pencampuran fraksi air dengan pelarut, kemudian akan terbentuk pemisahan fase. Pada penelitian ini, partisi dilakukan secara bertahap sebanyak tiga kali menggunakan pelarut EtOAc dengan perbandingan 1:1 menggunakan corong pisah 250 mL. Fraksi EtOAc ditampung di dalam Erlenmeyer 100 ml, kemudian pelarut dievaporasi dan ekstrak pekat ditimbang. Ekstrak pekat dilarutkan kembali dengan EtOAc dan disimpan di dalam botol vial 5 ml. Ekstrak kasar tersebut diidentifikasi senyawa antibakterinya dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

3.4.3. Identifikasi Senyawa Antibakteri *Bacillus* sp. TSR 6 dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi senyawa antibakteri *Bacillus* sp. TSR 6 dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan fasa gerak atau eluen yaitu N-Heks:EtOAc (7:3). Ekstrak kasar *Bacillus* sp. TSR 6 dibubuhkan pada lempeng KLT silika gel 60 F254 berukuran 4×0,6 cm menggunakan pipa kapiler hematokrit dan dielusi di dalam bejana tertutup dengan perbandingan eluen tersebut. Setelah itu, dilakukan tahap visualisasi dibawah sinar UV 254 nm untuk memperjelas letak noda pada lempeng KLT, selanjutnya direaksikan dengan reagen serium sulfat untuk mengidentifikasi adanya senyawa organik di dalam ekstrak tersebut. Tingkat kepolaran masing-masing senyawa diketahui dari nilai *Retardation factor* (Rf)/faktor penghambatan masing-masing noda. Nilai Rf dapat diketahui dengan rumus berikut (Nurdiani, 2018).

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang digerakan oleh senyawa}}{\text{Jarak yang digerakan oleh pelarut}}$$

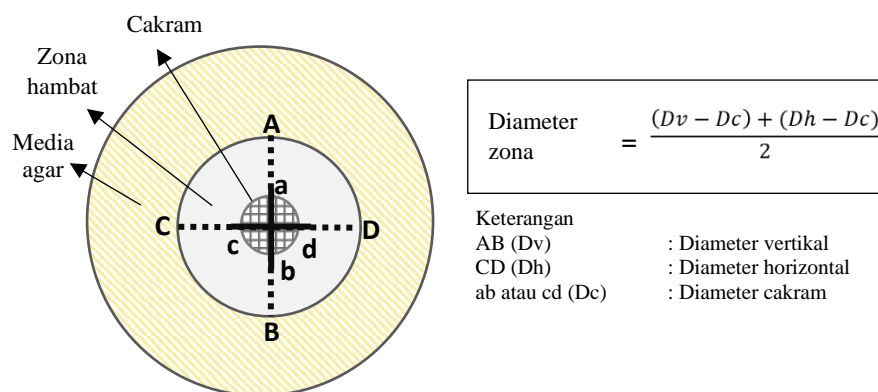
3.4.4. Skrining Awal Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar *Bacillus* sp. TSR 6 terhadap *Dickeya* sp. dengan Difusi Agar Cakram

Ekstrak kasar *Bacillus* sp. TSR 6 yang telah didapatkan selanjutnya dilakukan skrining awal aktivitas antibakteri terhadap *Dickeya* sp. melalui metode difusi agar cakram mengacu pada Balouiri *et al.* (2016). Stok ekstrak kasar dibuat konsentrasi 5000 µg/ml sebanyak 1 ml dalam pelarut MeOH. Suspensi bakteri patogen uji *Dickeya* sp. dibuat sesuai standar Mc. Farland 0,5 (1x10⁸ CFU/ml). Media yang digunakan yaitu MHA dengan komposisi (g/L): 2 g *beef extract*; 17,5 g *acid hydrolysate of casein*; 1,5 g *starch*; dan 17 g agar. Media

MHA dituang sebanyak 20 ml ke dalam cawan petri steril dan ditunggu hingga memadat.

Suspensi bakteri uji sesuai standar *Mc. Farland* 0,5 dengan kerapatan sel bakteri setara 1×10^8 CFU/ml diinokulasikan sebanyak 0,1 ml pada permukaan agar padat dan diratakan dengan *cotton buds* steril. Ekstrak kasar, kontrol positif (kloramfenikol), dan kontrol negatif (MeOH) diteteskan sebanyak 150 μ l pada masing-masing kertas cakram dengan diameter 0,5 mm kemudian ditunggu hingga mengering. Masing-masing kertas cakram yang sudah mengering diletakan di permukaan agar dan dibuat sebanyak 3 ulangan pada cawan Petri berbeda, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Aktivitas antibakteri ditandai dengan adanya zona jernih di sekitar kertas cakram.

Zona jernih yang terbentuk diukur diameternya dengan penggaris 30 cm. Pengukuran zona jernih dilakukan dengan posisi cawan petri terbalik. Zona jernih diukur diameternya secara vertikal dan horizontal. Hasil pengukuran diameter zona jernih secara vertikal dan horizontal dimasukkan ke dalam rumus perhitungan diameter zona hambat (Gambar 14) berdasarkan rumus Winastri dkk. (2020).



Gambar 14. Rumus perhitungan diameter zona hambat (Winastri dkk., 2020).

Zona hambat yang telah diukur kemudian dikategorikan daya hambatnya berdasarkan Kusuma dkk. (2022) yaitu jika <5 mm tergolong lemah; 5-10 mm tergolong sedang; 10-20 mm tergolong kuat; dan >20 mm tergolong sangat kuat.

3.4.5. Pemisahan Senyawa Antibakteri *Bacillus* sp. TSR 6 dengan Kromatografi Kolom Terbuka

Setelah diketahui adanya aktivitas antibakteri pada ekstrak kasar *Bacillus* sp. TSR 6 terhadap *Dickeya* sp., selanjutnya dilakukan pemisahan senyawa antibakteri dengan kromatografi kolom terbuka. Sebelum dilakukan pemisahan senyawa antibakteri, ekstrak kasar *Bacillus* sp. TSR 6 dilakukan KLT dengan beberapa kombinasi eluen. Tujuannya untuk memonitoring pola pemisahan noda pada kolom sehingga diketahui kombinasi eluen yang baik untuk memisahkan senyawa antibakteri dengan kromatografi kolom terbuka.

Pemisahan senyawa antibakteri dari ekstrak kasar dilakukan dengan kromatografi kolom terbuka menggunakan fase diam silika gel 60 (0,2-0,5 mm) dan fase gerak berupa beberapa jenis pelarut. Metode elusi yang digunakan yaitu metode elusi gradien dengan beberapa komposisi pelarut yang berbeda. Gradien eluen yang digunakan pada penelitian ini secara berurutan yaitu: N-Heks (100%); N-Heks:EtOAc (7:3); N-Heks:EtOAc (1:1); EtOAc (100%); EtOAc:IPA (1:1); IPA (100%); dan EtOH (100%).

Penyiapan kolom dengan cara silika gel 60 (0,2-0,5 mm) dibasahi dengan eluen pertama, kemudian dimasukkan ke dalam kolom hingga terisi setengah dari panjang kolom. Ekstrak kasar dimasukkan ke dalam kolom, selanjutnya dimasukkan secara bertahap gradien eluen ke dalam kolom. Eluen dibiarkan bergerak turun melalui kolom dan akan terbentuk fraksi hingga ujung kolom. Fraksi-fraksi sampel yang sudah

terpisah ditampung sebanyak 1 ml di dalam vial berukuran 5 ml. Sampel yang masih tersisa terus dilakukan elusi hingga menghasilkan fraksi-fraksi senyawa kandidat antibakteri. Fraksi-fraksi yang sudah terpisah masing-masing dilakukan analisis KLT (eluen EtOAc 100%) dan reaksi dengan serum sulfat untuk mengetahui keberadaan senyawa yang sudah terfraksinasi.

3.4.6. Uji Aktivitas Kandidat Senyawa Antibakteri *Bacillus* sp. TSR 6 terhadap *Dickeya* sp.

Fraksi-fraksi kandidat senyawa antibakteri yang telah didapatkan kemudian dilakukan skrining aktivitas antibakteri terhadap *Dickeya* sp.

3.4.6.1. Pembuatan konsentrasi stok senyawa kandidat antibakteri yang telah didapatkan

Masing-masing fraksi kandidat antibakteri pada skrining aktivitas senyawa kandidat antibakteri dengan difusi agar cakram dibuat konsentrasi stok 5000 µg/ml sebanyak 1 ml dalam pelarut MeOH. Setelah didapatkan fraksi yang aktif, kemudian fraksi tersebut dibuat konsentrasi stok 1000 µg/ml sebanyak 1 ml dalam pelarut DMSO 20% untuk penentuan KHM. Kontrol positif berupa kloramfenikol dibuat juga stok dan pelarut yang konsentrasinya menyesuaikan masing-masing uji.

3.4.6.2. Pembuatan suspensi bakteri patogen uji

Suspensi bakteri patogen *Dickeya* sp. berumur 24 jam diinokulasikan beberapa ose dari media NA miring ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml NaCl 0,85% steril dan

dihomogenkan. Turbiditas suspensi tersebut disesuaikan hingga setara standar *Mcfarland* 0,5 dengan kepadatan sel 1×10^8 CFU/ml. Suspensi *Dickeya* sp. dimasukkan sebanyak 200 μ l ke dalam sumur pelat mikro dengan tiga ulangan, kemudian nilai turbiditas diukur dengan *plate reader* pada panjang gelombang 600 nm hingga memperoleh rata-rata nilai turbiditas 0,08-0,12. Jika nilai turbiditas terlalu tinggi, dilakukan penambahan NaCl 0,85% steril, sedangkan jika nilai turbiditas terlalu rendah dapat dilakukan penambahan isolat *Dickeya* sp. hingga mencapai nilai turbiditas yang setara nilai turbiditas standar *Mcfarland* 0,5. Suspensi yang sudah sesuai standar *Mc. Farland* 0,5 diambil sebanyak 0,1 ml kemudian diencerkan di dalam 9,9 ml NaCl 0,85% atau media MHB sehingga diperoleh kepadatan sel 1×10^6 CFU/ml.

3.4.6.3. Skrining aktivitas senyawa kandidat antibakteri *Bacillus* sp. TSR 6 terhadap *Dickeya* sp. dengan difusi agar cakram

Media MHA dituang sebanyak 20 ml ke dalam cawan petri steril dan ditunggu hingga memadat, kemudian suspensi bakteri uji (1×10^6 CFU/ml) sebanyak 0,1 ml diinokulasikan dan di-*swab* pada permukaan agar padat. Masing-masing stok kandidat senyawa antibakteri konsentrasi 5000 μ g/ml, kontrol positif (kloramfenikol) 5000 μ g/ml, dan kontrol negatif (MeOH) diteteskan sebanyak 150 μ l pada kertas cakram dengan diameter 0,5 cm dan ditunggu hingga mengering.

Masing-masing kertas cakram yang sudah mengering diletakan di permukaan agar dan dibuat sebanyak 3 ulangan pada cawan Petri lain, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Aktivitas antibakteri ditandai dengan adanya zona jernih di sekitar kertas cakram. Zona jernih yang terbentuk kemudian diukur diameternya dengan penggaris 30 cm dan dimasukkan

ke rumus perhitungan zona hambat Winastri dkk. (2020) (Gambar 14.) dan dikategorikan daya hambatnya berdasarkan Kusuma dkk. (2022).

3.4.6.4. Identifikasi Awal Senyawa Antibakteri pada Fraksi Aktif dengan KLT

Fraksi yang aktif dalam menghambat *Dickeya* sp. kemudian dilakukan KLT untuk mengetahui komponen senyawanya. Eluen yang digunakan yaitu N-Heks:IPA (7:3) dan fase diam silika gel 60 F254. Visualisasi dibawah UV λ 254 nm dan dilakukan reaksi dengan reagen serum sulfat dan ninhidrin, selanjutnya dilakukan perhitungan nilai Rf untuk mengetahui polaritas masing-masing fraksi aktif.

3.4.6.5. Penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) dengan Mikrodilusi

Nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) atau *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dari masing-masing fraksi aktif dalam menghambat *Dickeya* sp. ditentukan melalui mikrodilusi cair berdasarkan metode Elshikh *et al.* (2016) dengan media MHB dan pelat mikro 96 lubang. Penentuan nilai KHM dilakukan sebanyak tiga kali ulangan, selanjutnya disiapkan masing-masing stok fraksi aktif 1000 $\mu\text{g/ml}$, stok kontrol positif kloramfenikol 1000 $\mu\text{g/ml}$, kontrol negatif pelarut DMSO 20%, kontrol pertumbuhan berupa inokulum *Dickeya* sp. dalam MHB, dan kontrol media MHB steril.

Mula-mula MHB steril dipipet sebanyak 100 μl ke dalam sumur pelat mikro 96 sumur dari baris 1A hingga 12F. Kolom A hingga C dibuat untuk pengenceran masing-masing sampel. Masing-masing larutan stok fraksi antibakteri dengan

konsentrasi 1000 µg/ml dipipet 100 µl ke dalam sumur pada kolom 1A, 1B, dan 1C berisi 100 µl MHB dan diencerkan dua kali lipat sebanyak 12 kali dengan volume yang diambil 100 µl dari baris 1 hingga 12 pada sumur, sisa pengenceran 100 µl pada sumur terakhir dibuang. Kontrol positif yaitu kloramfenikol juga dibuat seri pengenceran yang sama pada baris 1D-12D. Perbandingan larutan stok antibakteri dan medium yaitu 1:1 sehingga konsentrasi yang diujikan mulai dari 500 µg/ml turun setengahnya sampai dengan 0,2 µg/ml. Kontrol pertumbuhan dimasukkan sebanyak 100 µl pada baris 1E-12E. Kontrol negatif yaitu pelarut DMSO 20% dimasukkan pada baris 1F-12F. Kontrol MHB steril dimasukkan sebanyak 200 µl pada baris 1G-12G. Suspensi bakteri ditambahkan sebanyak 100 µl pada baris uji (1A-12C), kontrol positif (1D-12D), dan kontrol negatif (1F-12F). Inkubasi dilakukan selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, dilakukan pengukuran nilai turbiditas dengan *Plate reader* pada λ 600 nm untuk mengetahui nilai KHM.

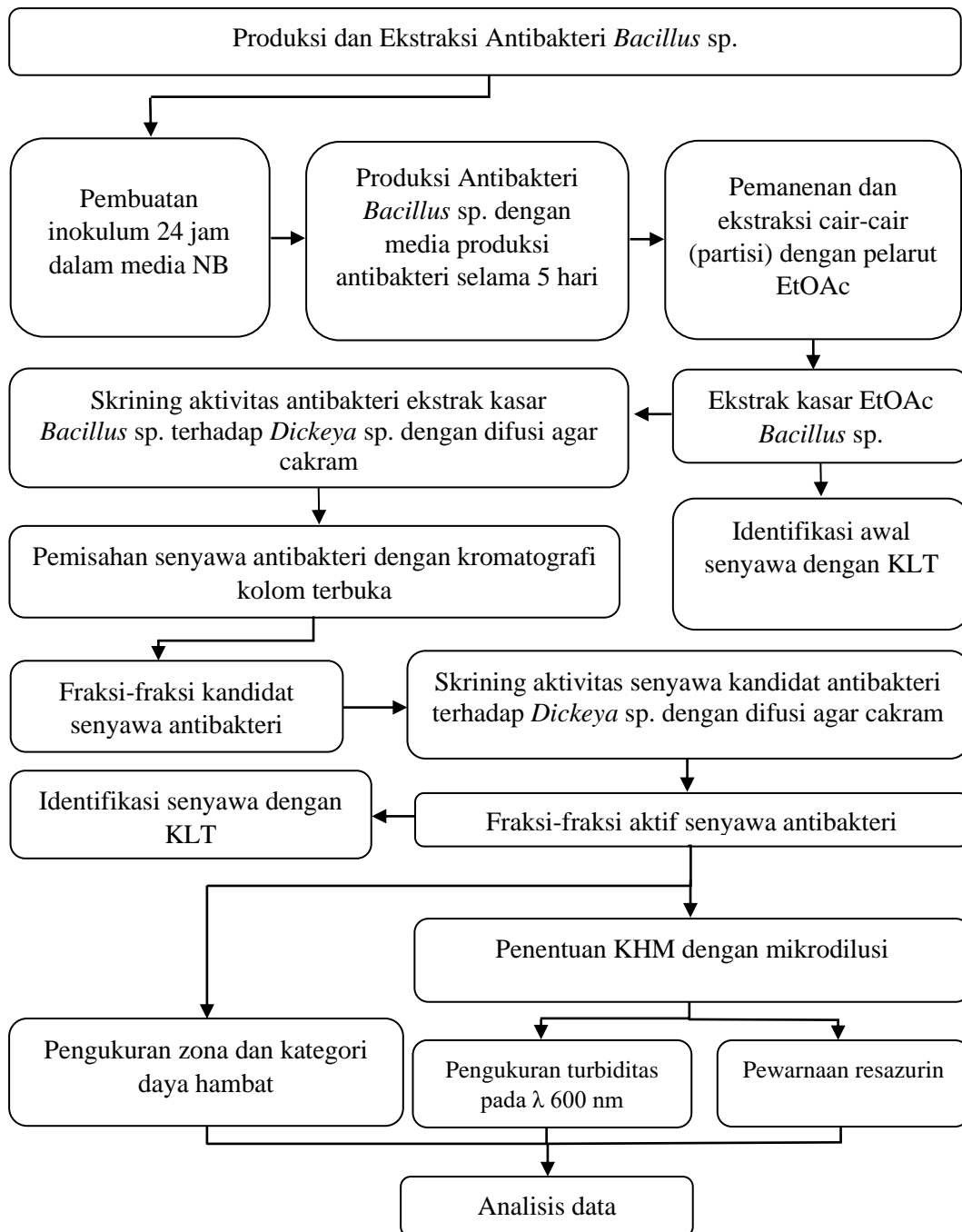
Setelah nilai turbiditas diukur, kemudian dilakukan penambahan pewarna resazurin sebanyak 30 µl setiap lubang sebagai uji kualitatif untuk mengetahui ada tidaknya sel bakteri yang hidup. Pengamatan dan pengukuran turbiditas dilakukan kembali setelah 2 dan 4 jam inkubasi dari pewarnaan resazurin. Nilai KHM ditentukan pada nilai konsentrasi uji terkecil yang menunjukkan nilai turbiditas paling rendah setelah inkubasi 18-24 jam dan warna resazurin yang tidak berubah setelah 2-4 jam.

3.4.7. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan ukuran zona hambat, interpretasi kategori daya hambat, nilai KHM serta turbiditas. Data disajikan dalam bentuk gambar, grafik, dan tabel.

3.5. Diagram Alir Penelitian

Alur penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 15 berikut:



Gambar 15. Diagram alir penelitian.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini disimpulkan bahwa *Bacillus* sp. asal tanah Kebun Raya Liwa (KRL) dengan kode isolat TSR 6 memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen tanaman *Dickeya* sp. Aktivitas senyawa antibakteri tertinggi hasil fraksinasi diperoleh melalui kromatografi kolom terbuka yaitu fraksi 54. Ukuran zona hambat sebesar 13,5 mm tergolong daya hambat yang kuat dengan nilai KHM 500 µg/ml.

5.2. Saran

Perlu dilakukan beberapa penelitian lanjutan untuk menambah informasi terkait potensi *Bacillus* sp. asal tanah dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder khususnya antibakteri terhadap patogen tanaman. Pengembangan yang mungkin dapat dilakukan untuk penelitian selanjutnya dan mendukung isolat *Bacillus* sp. TSR 6 dalam menghasilkan senyawa antibakteri yaitu:

1. Melakukan optimasi produksi senyawa antibakteri melalui modifikasi media produksi seperti sumber karbon, nitrogen, pH, dan suhu sehingga didapatkan senyawa antibakteri dengan konsentrasi yang optimal.

2. Analisis senyawa lebih lanjut pada kandidat senyawa antibakteri yang potensial seperti analisis FTIR, MALDI-TOF, serta kromatografi tingkat tinggi untuk mengetahui informasi terkait struktur, jenis, jumlah, dan karakter senyawa tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Alic, A., van Gijsegem, A., Pedron, J., Ravnikar, M., and Dreo, T. 2018. Diversity within the novel *Dickeya fangzhongdai* sp., isolated from infected orchids, water and pears. *Plant Pathology*. 67: 1612-1620.
- Arif, Adiba. 2015. Pengaruh Bahan Kimia Terhadap Penggunaan Pestisida Lingkungan. *Jurnal Kimia FMIPA Universitas Hasanudin*. 3(4): 134-143.
- Aronson, J K. 2016. *Chloramphenicol Meyler's Side Effects of Drugs*. Elsevier.
- Aryal, Sagar. 2018. Column Chromatography. <https://micrbenotes.com/column-chromatography/>, diakses pada 16 Februari 2021 pukul 11.20 WIB.
- Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibsuda, S K. 2016. Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6: 71-79.
- Barale, S., Ghane, S G., and Sonawane, K D. 2022. Purification and Characterization of Antibacterial Surfactin Isoforms Produced by *Bacillus velezensis* SK. *SMB Express*. 12(7): 1-20.
- Bhatt, P., Rathi, K R., Hazra, S., Sharma, A., and Shete, V. 2015. Prevalence of Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Burn Patients at a Tertiary Care Centre. *Indian Journal of Burns*. 23(1): 56-59.
- Bidang Pengembangan Kawasan Konservasi Tumbuhan Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya LIPI. 2016. Kebun Raya Liwa. <http://kebunrayadaerah.krbogor.lipi.go.id/kebun-raya-liwa.html>, diakses pada 1 Februari 2021 pukul 22.03 WIB.

- Boluk, G., Arizala, D., Dobhai, S., Zhang, J., Hu, J., Alvarez, A M., and Arif, M. 2021. Genomic and Phenotypic Biology of Novel Strains of *Dickeya zeeae* Isolated from Pineapple and Taro in Hawaii: Insights into Genome Plasticity, Pathogenicity, and Virulence Determinants. *Frontiers in Plant Science*. 12(663851): 1-26.
- Bouali, W., Malek, F., Sahin, F., and Abdelouahid, E. 2016. Morphological, Physiological, and Biochemical of Some Soil Isolates of *Bacillus cereus* Group from Algeria. *African Journal of Microbiology Research*. 10(29): 1094-1103.
- Calhoun, C., Wermuth, H R., and Hall, G A. 2020. *Antibiotics*. Treasure Island FL USA: StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535443/>, diakses pada 25 Oktober 2020 pukul 10.00 WIB.
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., and Mahillon, J. 2019. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Member of the *Bacillus subtilis* Group. *Frontiers in Microbiology*. 10(302): 1-19.
- Chen, J L., Steele, T W J., and Stuckey, D C. 2017. Metabolic Reduction of Resazurin; Location Within the Cell for Cytotoxicity Assays. *Biofuels and Environmental Biotechnology*. 1-28.
- Chi, N M., Anh, D T K., Hung, T X., Nhung N P., BaO H Q., Toan D V., Nga N T T., Thuy, P T T., Vo D N., and Dell B. 2021. Soft Rot Disease Caused *Dickeya fangzhongdai* in Epiphytic Orchids in Vietnam. *Canadian Journal of Plant Pathology*.
- Coskun, Ozlem. 2016. Separation Techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul*. 3(2): 156-160.
- Cote, C K., Heffron, J D., Bozue, J A., and Welkos, S L. 2015. *Molecular Medical Microbiology*. Volume Ketiga. Frederick, Maryland, USA: Academic Press.
- Czajkowski, R., de Boer, W J., van veen, J A., and van der Wolf, J M. 2011. Characterization of Bacterial Isolates from Rotting Potato Tuber Tissue Showing Antagonism to *Dickeya* sp. Biovar 3 *In Vitro* and *In Planta*. *Plant Pathology*. 61: 169-182.

- Dimkic, I., Janakiev, T., Petrovic, M., Degrassi, M., and Fira, D. 2022. Plant-Associated *Bacillus* and *Pseudomonas* Antimicrobial Activities in Plant Disease Suppression via Biological Control Mechanisms - A Review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 117: 1-13.
- Dimkic, I., Stankovic, S., Nisavic, M., Petkovic, M., Ristivojevic, P., Fira, D., and Beric, T. 2017. The Profile and Antimicrobial Activity of *Bacillus* Lipopeptide Extracts of Five Potential Biocontrol Strains. *Front Microbiology*. 8(925): 1-12.
- Dimkic, I., Zivkovic, S., Beric, T., Ivanovic, Z., Gavrilovic, V., Stankovic, S., and Fira, D. 2013. Characterization and Evaluation of Two *Bacillus* Strains, SS-12.6 and SS-13.1, as Potential Agents for The Control of Phytopathogenic Bacteria and Fungi. *Biological Control*. 65: 312-321.
- Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., and Banat, I M. 2016. Resazurin-Based 96-Well Plate Microdilution Method for The Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Biosurfactants. *Biotechnol Lett*. 38:1015-1019.
- Etebu, E and Arikekpar, I. 2016. Antibiotics: Classification and Mechanism of Action with Emphasis on Molecular Perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*. 4: 90-101.
- Fira, D., Dimkic, I., Beric, T., Lozo, J., and Stankovic, S. 2018. Biological Control of Plant Pathogens by *Bacillus* Species. *Journal of Biotechnology*. 1-44.
- Forestryana, D dan Arnida. 2020. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Jeruju (*Hydrolea spinosa* L.). *Jurnal Kimia Farmako Bahari*. 11(2):113-124.
- Guttenplan, S B., Shaw, S., and Kearns, D B. 2013. The Cell Biology of Peritrichous Flagella in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiology*. 87(1): 211-299.
- Hatmanti, Ariani. 2000. Pengenalan *Bacillus* spp. *Oseana*. 27(1): 31-41.
- Hossain, A., Masum, M M I., Wu, X., Abdallah, Y., Ogunyemi, S O., Wang, Y., Sun, G., Li, B., and An Q. 2020. Screening of *Bacillus* Strains in Biocontrol

of Pathogen *Dickeya dadantii* Causing Stem and Root Rot Disease of Sweet Potato. *Biocontrol Science and Technology*. 1-19.

Ignatov, A N., Lazarev, A M., Panycheva, J S., Provorov, N A., and Chebotar, V K. 2018. Potato Phytopatogens of Genus *Dickeya* — A Mini Review of Systematics and Etiology of Diseases. *Agricultural Biology*. 53(1): 123-131.

Jacques, Philippe. 2011. *Surfactin and Other Lipopeptides from Bacillus spp. on Microbiology Monographs Volume 20*. Munster, Jerman: Springer.

Khoiriyah, S., Hanapi, A., dan Fasya, A G. 2014. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform, dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *ALCHEMY*. 3(2): 133-144.

Krochmal, B K and Wicher, R D. 2021. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*. 10(165): 1-21.

Kusuma, I M., Jastian, S Y., dan Amir, M. 2022. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Kulit Buah Kawista (*Limonia acidissima*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Sainstech Farma*. 15(1): 31-34.

Lestari, Y., Ardiningsih, P., dan Nurlina. 2016. Aktivitas Antibakteri Gram Positif dan Negatif dari Ekstrak dan Fraksi Daun Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.) Asal Pesisir Sungai Kakap Kalimantan Barat. *JKK*. 5(4): 1-8.

Li, J., Hu, M., Xue, Y., Chen, X., Lu, G., Zhang, L., and Zhou, J U. 2020. Screening, Identification and Efficacy Evaluation of Antagonistic Bacteria for Biocontrol of Soft Rot Disease Caused by *Dickeya zea*. *Microorganisms*. 8(967): 1-19.

Li, J., Xie, S., Ahmed, S., Wang, F., Gu, Y., Zhang, C., Chai, X., Wu, Y., Cai, J., and Cheng, G. 2017. Antimicrobial Activity and Resistance: Influencing Factors. *Frontiers in Pharmacology*. 8(364): 1-11.

Liu, J., He, D., Li, X Z., Gao, S., Wu, H., Liu, W, Gao X., and Zhou, T. 2010. γ -Polyglutamic Acid (γ -PGA) Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* C06

Promoting its Colonization on Fruit Surface. *International Journal of Food Microbiology*. 142: 190-197.

Lizayana., Mudatstir., dan Iswadi. 2016. Densitas Bakteri Pada Limbah Cair Pasar Tradisional. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pendidikan Biologi*. 1(1): 95-106.

Mahfut., Anggraeny, A., Wahyuningsih, S., Handayani, T T., and Sukimin. 2020. Identification of Disease and Efforts to Protect Native Orchid Plants Against Bacteria Infection in Liwa Botanical Garden. *Journal of Physics Conference Series*. 1641: 1-8.

Malaka, R., Metusalach., dan Abustam, E. 2013. Pengaruh Jenis Mineral Terhadap Produksi Eksopolisakarida dan Karakteristik Pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* Strain Ropy dalam Media Susu. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Universitas Hasanudin. 592-598.

Meena, K R., Tandon, T., Sharma, A., and Kanwar, S S. 2018. Lipopeptide Antibiotic Production by *Bacillus valezensis* KLP2016. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 8(3): 091-098.

Miller, S I. 2016. Antibiotic Resistance and Regulation of the Gram Negative Bacterial Outer Membrane Barrier by Host Innate Immune Molecules. *American Society for Microbiology*. 7(5): 1-3.

Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. 7(2): 361-367.

Napitupulu, H G., Rumega, I F M., Wullur, S., dkk. 2019. *Bacillus* sp. Sebagai Agensia dalam Pemeliharaan *Brachionus rotundiformis* yang Menggunakan Ikan Mentah Sebagai Sumber Nutrisi. *Jurnal Ilmiah Platax*. 7(1): 158-169.

Nicolic, I., Beric, T., Dimkic, I., Popovic, T., Lozo, J., Fira, D., and Stankovic, S. 2018. Biological Control of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* on Sugar Beet with *Bacillus pumilus* SS-107 and *Bacillus amyloliquefaciens* (SS-12.6 and SS-38.4) Strains. *Applied Microbiology*. 126(1): 165-178.

Nurdiani, Dian. 2018. *Buku Informasi Melaksanakan Analisis Secara Kromatografi Konvensional Mengikuti Prosedur*. Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Guru dan Tenaga Kependidikan Pusat

Pengembangan dan Pemberdayaan Pendidik dan Tenaga Kependidikan Pertanian.

- Parray, A J dan Shameem, N. 2020. *Sustainable Agriculture Chapter 5 Metabolomics and Microbial Biocontrol Agents*. Academic Press: 181-229.
- Parkinson, N., Pritchard, L., Bryant, R., Toth, I., and Elphinstone, J. 2014. Epidemiology of *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani* in ornamental hosts and potato studied using variable number tandem repeat analysis. *Europe Journal Plant Pathology*. 1-8.
- Ponmurugan, P and Nithya, B. 2008. Plasmid DNA of Antibiotic Producing Strains of *Streptomyces sannanensis* Isolated from Different States in Southern India. *Asian Network for Scientific Information*. 7(3): 487-492.
- Pratiwi, L., Fudhol, A., Martien, R., dan Pramono, S. 2016. Ekstrak Etanol, Ekstrak Etil Asetat, Fraksi Etil Asetat, dan Fraksi N-Heksan Kulit Manggis (*Gracinia mangostana* L.) Sebagai Sumber Zat Bioaktif Penangkal Radikal Bebas. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. 01: 71-82.
- Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya LIPI. 2021. Kebun Raya Liwa. http://www.krbogor.lipi.go.id/id/isirow/isi_statis/75, diakses pada 1 Februari 2021 pukul 22.01 WIB.
- Puspita, F., Ali, M., dan Pratama, R. 2017. Isolasi dan Karakterisasi Morfologi dan Fisiologi Bakteri *Bacillus* sp. Endofitik dari Tanaman Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Jurnal Agroteknologi Trop*. 6(2): 44-49.
- Rajashekhar, M., Shahanaz., and Kaila, V K. 2017. Biochemical and Molecular Characterization *Bacillus* spp. Isolated from Insect. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 5(5): 581-588.
- Raoul des Essarts, Y., Cigna, J., Laurent, A Q., Caron, A., Munier, E., Cirou, A B., Hellas, V., and Faure, D. 2016. Biocontrol of the Potato Blackleg and Soft Rot Diseases Caused by *Dickeya dianthicola*. *Applied and Environmental Microbiology*. 82: 268-278.
- Reddy, S B. 2018. Thin Layer Chromatography: Manual Method. *Instrumentationtools.com*, diakses pada 16 Februari 2021 pukul 20.00 WIB.

- Royanti, V. 2022. Keanekaragaman *Bacillus* dari Tanah Kebun Raya Liwa. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung: Bandar Lampung.
- Sethi, S., Kumar, R., and Gupta, S. Antibiotic Production by Microbes Isolated from Soil. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 4(8): 2967-2973.
- Setiani, N A., Agustina, N., Mardiah, I., Hamdani, S., dan Astriany, D. 2020. Potensi *Bacillus cereus* dalam Produksi Biosurfaktan. *Jurnal Biologi Udayana*. 24(2): 135-141.
- Shiel, W C. 2021. Medical Definition of Antibacterial. [medicinenet.com/antibacterial/definition.html](https://www.medicinenet.com/antibacterial/definition.html), diakses pada 21 Februari 2021 pukul 11.00 WIB.
- Shinde, V A., More, S M., and Patil, R B. 2015. Screening and Isolation of Antibiotics Producing *Bacillus* Species Antagonistic to Fungal Pathogens. *International Journal Current Microbiology Application Science*. 4(11): 73-78.
- Shu, L J and Yang, Y L. 2017. *Bacillus* Classification Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry-Effects of Culture Conditions. *Scientific Reports*. 7: 1-10.
- Sueno, W S K., Marrero, G., de Silva, A S., Sether, D M., and Alvarez, A M. 2014. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *The American Phytopathological Society*. 98(6): 817-824.
- Sun, S., Liao, J., Sun, L., Wang, Y., Liy, Y., Deng, Q., Zhang, N., Xu, D., Fang, Z., Wang W., and Gooneratne, R. 2019. Effect of Media and Fermentation Conditions on Surfactin and Iturin Homologues Produced by *Bacillus natto* NT-6: LC-MS Analysis. *AMB Express*. 9(120): 1-9.
- Sunny F., Kurniati, T H., dan Hatmanti, A. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Senyawa Antibakteri yang Berasosiasi dengan Karang Batu dari Perairan Bitung dan Spons dari Selat Makassar. *Bioma*. 12(1): 42-49.

- Tan, J B L and Lim, Y Y. 2015. Critical Analysis of Current Methods for Assessing The *in vitro* Antioxidant and Antibacterial Activity of Plant Extract. *Food Chemistry*. 172: 814-822.
- Tasaki, S., Nakayama, N., and Shoji, W. 2017. Morphologies of *Bacillus subtilis* Communities Responding to Environmental Variation. *Review Article Development Growth and Differentiation*. 59: 369-378.
- Tinajero, S R., Hernandez, E O., Drouaillet, B E., and Espinosa, J H T S. 2021. *In vitro* Antagonist Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and *Dickeya chrysanthemi*. *Mexican Journal of Phytopathology*. 39(3): 515-528.
- Torres, Jessica. 2016. The Basics of Running a Chromatography Column. <https://bitesizebio.com/29947/basics-chromatography-column/>, diakses pada 16 Februari 2021 pukul 22.40 WIB.
- Toth, I K., van der Wolf, J M., Saddler, G., Lojkowska, E., Helias, V., Pirhonen, M., Tsrer, L., and Elphinstone, J G. 2011. *Dickeya* Species: An Emerging Problem for Potato Production in Europe. *Plant Pathology*. 60: 385-399.
- Tran, C., Cock, I E., Chen, X., and Feng, Y. 2022. Antimicrobial *Bacillus*: Metabolites and Their Mode of Action. *Antibiotics*. 11(88): 1-25.
- Turnbull, P C B. 2004. *Medical Microbiology 4th Edition*. Galveston: University of Texas Medical.
- Ullah, H and Ali, S. 2017. Classification of Anti-Bacterial Agents and Their Functions. *Antibacterial Agents*. 1-16.
- Usta, A and Demirkan, E. 2013. The Effect of Growth Parameters on The Antibiotic Activity and Sporulation in *Bacillus* spp. Isolated from Soil. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Science*. 2(5): 2310-2313.
- van der Wolf, J M., Nijhuis, E H., Kowalewska, M J., et al. 2014. *Dickeya solani* sp. nov., a Pectinolytic Plant-Pathogenic Bacterium Isolated from Potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64: 768-774.

- Vineetha, N., Vignesh, R A., and Sridhar, D. 2015. Preparation, Standardization of Antibiotic Discs and Study of Resistance Pattern for First-Line Antibiotics in Isolates from Clinical Samples. *International Journal of Applied Research*. 1(11):624-631.
- Wada, T., Noda, M., Kashiwabara, F., Jeon, J H., Shirakawa, A., Yabu, H., Matoba, Y., Kumagai, T., and Sugiyama, M. 2009. *Microbiology*. 155: 1726-1737.
- Wafula, E N., Kinyua, J., Karuiki, D., *et al.* 2013. Isolation and Characterization of *Bacillus* Species from Soil in Ngere Tea Catchment Area of Murang'a County, Kenya. *International Journal of Life Science Research*. 2(3): 27-35.
- Wang, C., Cao, Y., Wang, Y., Sun, L., and Song, H. 2019. Enhancing Surfactin Production by Using Systematic CRISPRi Repression to Screen Amino Acid Biosynthesis Genes in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*. 18(90): 1-13.
- Walker, M C and van der Donk, W A. 2016. The Many Roles of Glutamate in Metabolism. *Journal Ind Microbiol Biotechnol*. 43(0): 419-430.
- Wilyasari, R S., Yulianty., Zulkifli., dan Nurcahyani, E. 2020. Morphological Characteristics of Araceae Plants in Liwa Botanical Garden, West Lampung. *Jurnal Ilmiah Biologi Eksperimen dan Keanekaragaman Hayati*. 7(1): 35-40.
- Winastri, N L A P., Muliastri, H., dan Hidayati, E. 2020. Aktivitas Antibakteri Air Perasan Rebusan Daun Calincing (*Oxalis corniculata* L.). *Berita Biologi Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*. 19(2): 223-230.
- Wiyada, Mongkolthanaruk. 2012. Classification of *Bacillus* Beneficial Substances Related to Plants, Humans, and Animals. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22(12): 1597-1604.
- Wulandari, Lestyo. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT Taman Kampus Presindo.
- Yani, R B., Agustien, A., dan Alamsjah, F. 2019. Pengaruh pH dan Suhu terhadap Produksi Antibiotika dari Isolat Bakteri Endofitik pada Tumbuhan Andalas (*Morus macroura* Miq.). *Jurnal Metamorfosa*. 6(1): 90-96.

Zabala, D., Brana, A F., Salas, J A., and Mendez, C. 2016. Increasing Antibiotic Production Yields by Favoring The Biosynthesis of Precursor Metabolites Glucose-1-Phosphate and/or Malonyl Co-A in *Streptomyces* Producer Strains. *The Journal of Antibiotics*. 69:179-182.