

**ISOLASI, KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS  
ANTIBIOTIK BAKTERI ASAL SAMPEL AIR DANAU  
BIRU, KOTA SAWAHLUNTO, SUMATERA BARAT**

**SKRIPSI SARJANA FARMASI**

Oleh:

**MARHANI DWITHANIA**

**No. BP: 1511014020**



**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG  
2019**

## PERNYATAAN ORISINILITAS DAN PENYERAHAN HAK CIPTA

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Marhani Dwithania  
No. BP : 1511014020  
Judul Skripsi : Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Aktivitas Antibiotik Bakteri Asal Sampel Air Danau Biru, Kota Sawahlunto, Sumatera Barat.

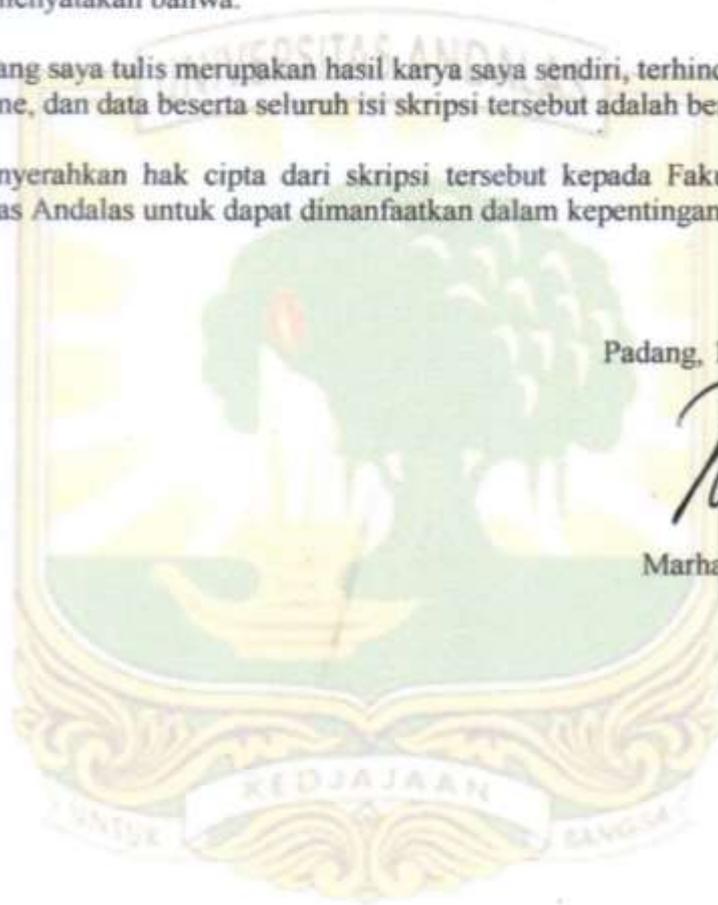
Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi yang saya tulis merupakan hasil karya saya sendiri, terhindar dari unsur plagiarisme, dan data beserta seluruh isi skripsi tersebut adalah benar adanya
2. Saya menyerahkan hak cipta dari skripsi tersebut kepada Fakultas Farmasi Universitas Andalas untuk dapat dimanfaatkan dalam kepentingan akademis

Padang, 16 April 2019



Marhani Dwithania

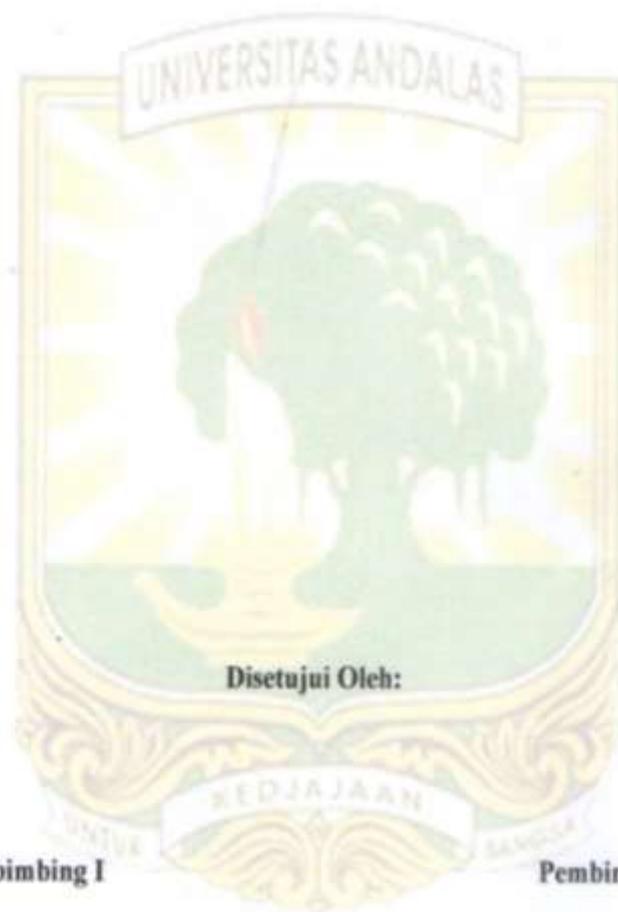


**Skripsi Ini Diajukan sebagai Salah Satu Syarat untuk Menempuh Ujian**

**Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi**

**Universitas Andalas**

**Padang**



**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

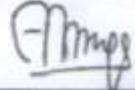
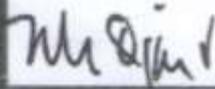
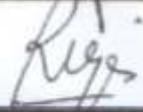
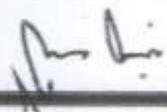
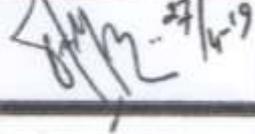
**Prof. Dr. H. Akmal Djamaan, MS, Apt.**

**Dr. Regina Andayani, S.Si., M.Si., Apt.**

Skripsi Ini Telah Dipertahankan Pada Seminar Hasil Penelitian

Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang

Pada Tanggal : 16 April 2019

No	Nama	Jabatan	Tanda Tangan
1	Dr. Netty Suharti, MS.	Ketua	
2	Prof. Dr. H. Akmal Djamaan, MS., Apt.	Anggota	
3	Dr. Regina Andayani, M.Si., Apt.	Anggota	
4	Prof. Dr. Hj. Marlina, MS., Apt.	Anggota	
5	Fithriani Armin, S.Si., M.Si., Apt.	Anggota	 27/4/19

## KATA PENGANTAR

### *Bismillahirrahmanirrahim*

Alhamdulillahirabbil'alamin, segala puji dan syukur penulis ucapkan kehadirat Allah SWT, karena berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini yang berjudul **“ISOLASI, KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBIOTIK BAKTERI ASAL SAMPEL AIR DANAU BIRU, KOTA SAWAHLUNTO, SUMATERA BARAT”**. Skripsi ini diajukan untuk melengkapi tugas akhir dan merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan Pendidikan Strata Satu pada Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang.

Penulisan skripsi ini tidak lepas dari doa dan dukungan yang diberikan oleh orang tua, keluarga besar dan rekan-rekan tersayang. Sebagai wujud terima kasih penulis yang tak terhingga kepada semua orang yang sudah berjasa memberikan waktu dan kesempatan, terimalah ini sebagai bentuk bakti dan cinta kasih penulis. Pada kesempatan ini perkenankan penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang setulusnya kepada:

1. Kedua orang tua saya, H. Busmar Harto, S.H., M.M. dan Hj. Dwi Korvijos, SKM, M.M., kakak (dr. Mareza Dwithania) serta keluarga besar yang selalu memberikan doa, dukungan, perhatian dan semua yang saya butuhkan dalam menempuh pendidikan selama ini.
2. Bapak Prof. Dr. H. Akmal Djamaan, MS., Apt. dan Ibu Dr. Regina Andayani, M.Si., Apt. selaku pembimbing yang telah meluangkan waktu, memberikan nasihat, membimbing dengan sabar dan memberikan ilmu sampai skripsi ini terselesaikan.
3. Ibu Lili Fitriani, S.Si., M.Pharm.Sc., Apt. selaku pembimbing akademik yang selalu menasihati, memberikan arahan dan motivasi selama penulis menempuh pendidikan.
4. Ibu Dr. Netty Suharti, MS., Ibu Prof. Dr. Marlina, MS, Apt. serta Ibu Fithriani Armin, S.Si, M.Si, Apt. sebagai pembahas yang telah banyak mengarahkan dan

memberi ilmu kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.

5. Ibu Dr. Rustini, M.Si., Apt. Bapak Prof. Dr. Dayar Arbain, Apt. dan Bapak Dr. Friardi, Ph.D, Apt. yang sudah memberi arahan kepada penulis dalam penelitian sampai skripsi ini terselesaikan.
6. Bapak dan Ibu staf pengajar, analis laboratorium dan karyawan-karyawati Fakultas Farmasi Universitas Andalas.
7. Bapak Zul dari Balai Veteriner Bukittinggi yang telah membantu mengidentifikasi isolat bakteri asal air Danau Biru dan Kakak Miftahul Jannah, S.Si., M.Biotek. yang telah sabar mengajarkan dan mengarahkan penulis selama penelitian.
8. Orang-orang terdekat, terutama Rahmat Hidayat dan teman-teman dari KKN Pariangan tahun 2018 terkhusus Jorong Guguak (Ila, RW, Indah, Ipeh, Uwi, Nidoy, Icis dan Wawan) yang selalu memberikan doa, semangat dan dukungan demi kelancaran penelitian dan penulisan skripsi ini.
9. Rekan-rekan Laboratorium Bioteknologi Hanny Tri Gustia, Hayatun Nufus, Annisa Dewi Fajar, Adhiny Disti Helmi dan Septia Chandra Kesi yang sudah membantu dan memberi semangat selama penelitian dan penulisan skripsi.
10. Teman-teman angkatan 2015 (X-Pecto), Keluarga Besar Mahasiswa Farmasi (KBMF) dan semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan doa serta dukungan selama penelitian dan penulisan skripsi ini, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada semua pihak yang telah membantu penulis. Aamiin Yaa Rabbal'aalamiin.

Dalam penulisan skripsi ini, penulis menyadari masih banyak terdapat kekurangan dan jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis dengan senang hati menerima kritik dan saran yang membangun dari semua pihak. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Padang, 16 April 2019

Penulis

**ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN UJI AKTIVITAS ANTIBIOTIK  
BAKTERI ASAL SAMPEL AIR DANAU BIRU, KOTA SAWAHLUNTO,  
SUMATERA BARAT**

**ABSTRAK**

Penelitian ini mengenai isolasi, karakterisasi dan uji aktivitas antibiotik bakteri asal sampel air Danau Biru, Kota Sawahlunto, Sumatera Barat. Peningkatan penyakit infeksi oleh bakteri telah menjadi masalah serius di seluruh dunia. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh isolat bakteri dari air Danau Biru yang memiliki aktivitas antibiotik dan mengetahui karakteristiknya. Aktivitas antibiotik bakteri diuji menggunakan metode difusi agar dengan bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Karakterisasi bakteri dilakukan secara makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia. Hasil penelitian ini didapatkan delapan isolat bakteri penghasil antibiotik dan dua isolat memiliki aktivitas antibiotik sangat potensial, yaitu isolat ADB 2.2 dan ADB 3 dengan diameter hambat >30 mm. Hasil karakterisasi isolat bakteri penghasil antibiotik dikelompokkan dalam empat genus berbeda, yaitu *Enterobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. Isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibiotik paling potensial dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis dengan fasa gerak toluen: etil asetat: asam format (7: 2.5: 0.5) dan heksan: etil asetat (2.5: 7.5). Didapatkan dua noda dari isolat ADB 2.2 dan enam noda dari ADB 3 dengan fasa gerak toluene-etil asetat-asam format serta empat noda dari ADB 2.2 dan lima noda dari ADB 3 dengan fasa gerak heksan-etil asetat.

Kata kunci: isolasi, antibiotik, difusi agar, Danau Biru

**ISOLATION, CHARACTERIZATION, AND ANTIBIOTIC ACTIVITIES  
TEST FROM BACTERIA OF BLUE LAKE WATER SAMPLE,  
SAWAHLUNTO, WEST SUMATERA**

**ABSTRACT**

This research is about isolation, characterization, and antibiotic activity from bacteria of Blue Lake water sample, Sawahlunto, West Sumatera. The increased of bacterial infectious diseases has become a serious problem throughout the world. Therefore, the purpose of this study was to obtain bacterial isolates from Blue Lake water which has antibiotic activity and know their characteristics. Antibiotic activity of bacteria isolates was carried out by using agar disc diffusion method toward *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922. Characterization of bacteria was carried out by macroscopically, microscopically, and biochemical testing. The results of this study showed eight isolates of antibiotic-producing bacteria and two isolates gave very potential antibiotic activity, isolates ADB 2.2 and ADB 3 with >30 mm inhibitory diameters. The characterization results of antibiotic-producing bacteria isolates are grouped in four different genera, there are *Enterobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., and *Pseudomonas* sp. Bacterial isolates which has the most potential antibiotic activity were analyzed using thin layer chromatography with mobile phase toluene: ethyl acetate: formic acid (7: 2.5: 0.5) and hexane: ethyl acetate (2.5: 7.5). Two bands were obtained from ADB 2.2 and six bands from ADB 3 with toluene-ethyl acetate-formic acid and four bands from ADB 2.2 and five bands from ADB 3 with hexane-ethyl acetate.

Keyword: isolation, antibiotic, agar disc diffusion, Blue Lake

## DAFTAR ISI

<b>JUDUL</b> .....	<b>1</b>
<b>PERNYATAAN ORISINILITAS DAN PENYERAHAN HAK CIPTA</b> .....	<b>ii</b>
<b>PENGESAHAN</b> .....	Error! Bookmark not defined.
<b>PERTAHANAN SKRIPSI</b> .....	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Antibiotik .....	4
2.1.1 Eksplorasi Antibiotik dari Alam .....	4
2.1.1.1 Tanah.....	4
2.1.1.2 Jaringan Tanaman.....	5
2.1.1.3 Spons Laut .....	5
2.1.1.4 Air .....	6
2.1.2 Penggolongan Antibiotik .....	7
2.1.2.1 Berdasarkan Sifat Toksisitas Selektif.....	7
2.1.2.2 Berdasarkan Mekanisme Kerjanya terhadap Bakteri.....	7
2.1.2.3 Berdasarkan Struktur Kimia Antibiotik .....	9
2.2 Bakteri .....	12
2.2.1 Bentuk Sel Bakteri.....	12
2.2.1.1 Basil .....	12
2.2.1.2 Kokus .....	12
2.2.1.3 Spiral.....	12

2.2.2 Metode Isolasi Bakteri .....	13
2.2.2.1 <i>Streak Plate</i> .....	13
2.2.2.2 <i>Pour Plate</i> .....	13
2.2.2.3 <i>Spread Plate</i> .....	14
2.3 Resistensi .....	15
2.4 Mikroorganisme Uji .....	15
2.4.1 <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	16
2.4.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
2.4.4 <i>Streptococcus mutans</i> .....	17
2.5 Fermentasi untuk Produksi Metabolit .....	17
2.6 Danau Biru .....	18
2.7 Metode Pengujian Aktivitas Antibiotik dengan Metode Difusi .....	19
2.8 Ekstraksi dengan Cara Maserasi .....	20
2.9 Metode Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis .....	22
2.9.1 Kromatografi Lapis Tipis .....	22
2.9.1.1 Fase Diam KLT .....	23
2.9.1.2 Fase Gerak pada KLT .....	23
2.9.1.3 Aplikasi Penotolan Sampel .....	24
2.9.1.4 Pengembangan KLT .....	24
2.9.1.5 Deteksi Bercak Noda KLT .....	24
<b>3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>25</b>
3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian.....	25
3.2 Metoda Penelitian.....	25
3.3 Alat dan Bahan .....	25
3.3.1 Alat.....	25
3.3.2 Bahan .....	26
3.4 Prosedur Penelitian.....	26
3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan .....	26
3.4.1 Pengambilan Sampel .....	27
3.4.3 Pembuatan Medium dan Penampak Noda.....	27

3.4.3.1 Nutrien Agar (NA) .....	27
3.4.3.2 Nutrien Broth (NB) .....	27
3.4.3.3 Mannitol Salt Agar .....	28
3.4.3.4 Tryptone Soya Agar .....	28
3.4.3.5 Cetrimide Agar .....	28
3.4.3.6 Endo Agar .....	28
3.4.3.7 Eosin Methylen Blue Agar .....	28
3.4.3.8 Anisaldehyd Sulfuric Acid (ANS) .....	28
3.4.4 Pembiakan Bakteri Uji .....	29
3.4.5 Isolasi dan Pemurnian Bakteri .....	29
3.4.5.1 Isolasi Bakteri .....	29
3.4.5.2 Pemurnian Bakteri .....	29
3.4.6 Pengujian Konfirmasi Bakteri Uji yang Digunakan .....	30
3.4.6.1 <i>S. aureus</i> ATCC 25923 dengan Mannitol Salt Agar .....	30
3.4.6.2 <i>S. mutans</i> ATCC 25175 dengan Tryptone Soya Agar .....	30
3.4.6.3 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 dengan Cetrimide Agar .....	30
3.4.6.4 <i>E. coli</i> ATCC 25922 dengan Endo Agar dan Eosin Methylen Blue Agar .....	30
3.4.7 Produksi Antibiotik dari Isolat Bakteri .....	31
3.4.7.1 Pembuatan Suspensi Bakteri .....	31
3.4.7.2 Produksi Antibiotik .....	31
3.4.7.3 Uji Aktivitas Antibiotik .....	31
3.4.8 Karakterisasi Isolat Bakteri Penghasil Antibiotik .....	32
3.4.8.1 Pengamatan Makroskopis .....	32
3.4.8.2 Pengamatan Mikroskopis .....	32
3.4.8.3 Uji Biokimia .....	32
3.4.9 Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder .....	38
3.4.10 Melihat Profil Metabolit Sekunder dari Bakteri menggunakan Kromatografi Lapis Tipis .....	38
3.5 Analisis Data .....	38
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>38</b>

<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>62</b>
5.1 Kesimpulan .....	62
5.2 Saran.....	62
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>63</b>



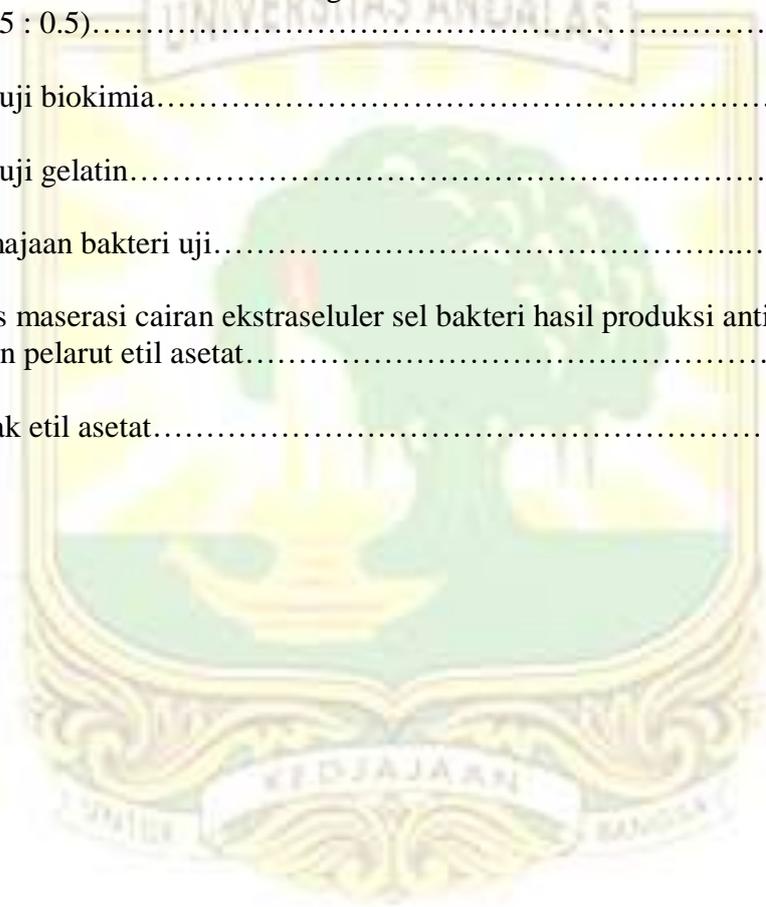
## DAFTAR TABEL

1. Hasil analisis geokimia pada air asam tambang di Danau Biru .....	16
2. Persyaratan kualitas air minum menurut Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 492 Tahun 2010.....	17
3. Hasil pengamatan makroskopis isolat bakteri dari air Danau Biru yang berpotensi sebagai penghasil antibiotik.....	36
4. Hasil diameter hambat pada uji aktivitas antibiotik isolat bakteri dari air Danau Biru.....	43
5. Hasil identifikasi secara biokimia isolat bakteri dari air Danau Biru yang berpotensi sebagai penghasil antibiotik.....	49
6. Nilai Rf dari profil metabolit sekunder bakteri menggunakan kromatografi lapis tipis dengan eluen toluen : etil asetat : asam format (7 : 2.5 : 0.5).....	61
7. Nilai Rf dari profil metabolit sekunder bakteri menggunakan kromatografi lapis tipis dengan eluen heksan : etil asetat (2.5 : 7.5).....	61
8. Daftar isolat bakteri dari air Danau Biru.....	71
8-9. Hasil pengamatan mikroskopis isolat bakteri dari air Danau Biru yang berpotensi sebagai penghasil antibiotik.....	72
9-10. Hasil uji aktivitas antibiotik isolat bakteri ADB 1 dan ADB 1.1 dari air Danau Biru.....	73
10-11. Hasil uji aktivitas antibiotik isolat bakteri ADB 2 dan ADB 2.1 dari air Danau Biru.....	74
11-12. Hasil uji aktivitas antibiotik isolat bakteri ADB 2.2 dan ADB 3 dari air Danau Biru.....	75
12-13. Hasil uji aktivitas antibiotik isolat bakteri ADB 4.1 dan ADB 5.2 dari air Danau Biru.....	76

## DAFTAR GAMBAR

1. <u>Metode streak-plate dengan goresan kuadran</u> .....	11
2. <u>Metode Pour Plate</u> .....	12
3. <u>Metode Spread Plate menggunakan kaca</u> .....	12
4. Pengamatan mikroskopis bakteri <i>E. coli</i> dibawah mikroskop.....	36
5. Pengamatan mikroskopis bakteri <i>P.aeruginosa</i> dibawah mikroskop.....	37
6. Pengamatan mikroskopis bakteri <i>S. aureus</i> dibawah mikroskop.....	37
7. Pengamatan mikroskopis bakteri <i>S. mutans</i> dibawah mikroskop.....	37
8. Pengujian konfirmasi bakteri uji <u><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</u> dengan media Mannitol Salt Agar (MSA).....	38
9. Pengujian konfirmasi bakteri uji <u><i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</u> dengan media Tryptone Soya Agar (TSA).....	39
10. Pengujian konfirmasi bakteri uji <u><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</u> dengan media Cetrimide Agar.....	39
11. Pengujian Konfirmasi Bakteri Uji <u><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</u> dengan Media Endo Agar dan EMBA.....	40
12. <u>Pewarnaan Gram dan pengamatan isolat bakteri di bawah mikroskop</u> .....	47
13. Profil kromatografi metabolit sekunder ekstrak etil asetat isolat bakteri dari air Danau Biru dengan eluen toluen: etil asetat: asam format (7 : 2.5 : 0.5) dengan penampak noda ANS.....	58
14. Profil kromatografi metabolit sekunder ekstrak etil asetat isolat bakteri dari air Danau Biru dengan eluen heksan : etil asetat (2.5 : 7.5) dengan penampak noda ANS.....	59
15. Lokasi pengambilan sampel di Danau Biru Kota Sawahlunto.....	70
16. <u>Pengamatan makroskopis isolat bakteri</u> dari air Danau Biru.....	77
17. Hasil uji biokimia dari Laboratorium Balai Penyidik dan Pengujian Veteriner Regional II Bukittinggi, Provinsi Sumatera Barat.....	78

18. Profil kromatografi metabolit sekunder ekstrak etil asetat isolat bakteri ADB 2.2 dari air Danau Biru dengan eluen heksan : etil asetat (2.5 : 7.5).....	80
19. Profil kromatografi metabolit sekunder ekstrak etil asetat isolat bakteri ADB 3 dari air Danau Biru dengan eluen heksan : etil asetat (2.5 : 7.5).....	80
20. Profil kromatografi metabolit sekunder ekstrak etil asetat isolat bakteri ADB 2.2 dari air Danau Biru dengan eluen toluen: etil asetat: asam format (7 : 2.5 : 0.5).....	81
21. Profil kromatografi metabolit sekunder ekstrak etil asetat isolat bakteri ADB 3 dari air Danau Biru dengan eluen toluen : etil asetat : asam format (7 : 2.5 : 0.5).....	81
22. Hasil uji biokimia.....	82
23. Hasil uji gelatin.....	83
24. Peremajaan bakteri uji.....	84
25. Proses maserasi cairan ekstraseluler sel bakteri hasil produksi antibiotik dengan pelarut etil asetat.....	85
26. Ekstrak etil asetat.....	86



## DAFTAR LAMPIRAN

1. Data Penelitian.....	70
2. Skema Kerja Penelitian.....	79
3. Gambar Penelitian.....	80



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Peningkatan penyakit infeksi oleh bakteri telah menjadi masalah serius di seluruh dunia (1). Pilihan pengobatan penyakit infeksi oleh bakteri menggunakan antibiotik, dimana antibiotik ini adalah metabolit sekunder yang dihasilkan bakteri. Penemuan dan pengembangan obat antibiotik baru sangat dibutuhkan. Metabolit sekunder merupakan senyawa hasil metabolisme mikroorganisme yang tidak berperan penting dalam pertumbuhan makhluk hidup tersebut, namun berperan sebagai pelindung bagi penghasilnya, umumnya dihasilkan dalam jumlah yang sedikit (2). Metabolit sekunder bakteri adalah sumber dari banyaknya antibiotik, obat kemoterapi, immunosupresan dan obat lainnya (3).

Bakteri dapat menjadi resisten karena penggunaan antibiotik yang tidak tepat. Resistensi merupakan suatu dampak negatif dari pemakaian antibiotik yang irasional, penggunaan antibiotik dengan indikasi yang tidak tepat, dosis yang tidak mencukupi, lama pemakaian yang tidak sesuai, cara pemakaian yang kurang tepat dan pemakaian antibiotik secara berlebihan (4).

Di Indonesia, ditemukan 30% sampai dengan 80% penggunaan antibiotik tidak berdasarkan indikasi (5). Sejak tahun 2011, WHO sudah menggalakkan tema “*Antimicrobial Resistance and it's Global Spread*”, hingga saat ini sosialisasi pengobatan secara rasional terus digencarkan. Menurut Putri *et al.*, (2018), beberapa infeksi bakteri yang paling sering terjadi dalam perawatan kesehatan ~~dan mengalami resistensi~~ disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus mutans* (6). Penyakit akan sulit untuk diobati yang akan berdampak pada semakin parahnya suatu penyakit hingga menyebabkan kematian. Oleh karena itu, diperlukan eksplorasi bakteri penghasil antibiotik yang dapat mengobati infeksi oleh bakteri yang sudah resisten.

Sejauh ini, eksplorasi sumber senyawa bioaktif dari mikoba terus dilakukan seiring dengan makin banyaknya penyakit baru yang bermunculan sehingga dapat menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang sangat potensial untuk

dikembangkan menjadi obat (7). Eksplorasi antibiotik itu dapat dari alam, seperti tanah, jaringan tanaman (endofitik), air laut, spons laut dan air danau seperti Danau Biru.

Danau Biru merupakan lubang bekas galian tambang batubara di Kota Sawahlunto yang berisi air yang berasal dari air hujan, danau ini terlihat berwarna biru sehingga warga sekitar menyebutnya dengan Danau Biru yang saat ini dijadikan objek wisata ~~oleh Dinas Pariwisata Kota Sawahlunto~~. Menurut Forqan (2005) air yang berada pada lubang bekas tambang batubara mengandung beberapa unsur kimia yaitu Fe, SO<sub>4</sub>, Hg, Pb, dan Mn. Telah dilakukan juga pengukuran pH air Danau Biru yaitu 5 yang menunjukkan bahwa air cukup asam (8). Pada umumnya, bakteri hidup di lingkungan dengan pH netral, tetapi ada bakteri yang juga dapat hidup di lingkungan asam, seperti *Vibrio alginolyticus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas veronii* dan *Bacillus cereus* (9). Dengan keunikan dan kondisi lingkungan yang ekstrem pada air Danau Biru, diindikasikan adanya bakteri yang dapat hidup dan potensial menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologis kuat, seperti penghasil antibiotik.

World Health Organization (2014) juga telah menetapkan bahwa lebih dari sekitar empat juta orang meninggal di seluruh dunia akibat penyakit infeksi yang disebabkan oleh air (10). Menurut hasil penelitian yang dilakukan Zhang *et al.*, (2018), air Danau Urban di China sudah terkontaminasi oleh bakteri (11). Berdasarkan uraian di atas, perlu dilakukan eksplorasi dan identifikasi bakteri yang terdapat pada air Danau Biru Kota Sawahlunto.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah air Danau Biru memiliki bakteri yang mempunyai aktivitas antibiotik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 ~~*Escherichia coli* ATCC 25922~~, ~~*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853~~, ~~*Staphylococcus aureus* ATCC 25923~~ dan ~~*Streptococcus mutans* ATCC 25175~~?

2. Bagaimanakah karakteristik isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibiotik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Escherichia coli* ATCC 25922?

### 1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui air Danau Biru memiliki bakteri yang mempunyai aktivitas antibiotik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Escherichia coli* ATCC 25922, ~~*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175~~
2. Untuk mengetahui karakteristik isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibiotik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Escherichia coli* ATCC 25922, ~~*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,~~

### 1.4 Manfaat Penelitian

1. Diperolehnya bakteri penghasil antibiotik yang berasal dari air Danau Biru sehingga didapatkan senyawa bioaktif yang dapat dijadikan sebagai antibiotik.
2. Menambah khazanah ilmu pengetahuan dan informasi bakteri penghasil antibiotik.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Antibiotik

Antibiotik didefinisikan sebagai senyawa yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme yang dapat membunuh dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya. Munculnya metode sintesis telah menghasilkan modifikasi definisi dari antibiotik, yang sekarang mengacu pada senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme atau senyawa serupa, yang dalam konsentrasi rendah dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya ~~[4,5]~~ (12). Antibiotik atau obat antibakteri adalah agen antimikroba yang paling umum digunakan dan disalahgunakan dalam mengobati infeksi bakteri. Antibiotik telah digunakan lebih dari 50 tahun untuk meningkatkan kesehatan manusia dan hewan (13).

#### 2.1.1 Eksplorasi Antibiotik dari Alam

Eksplorasi senyawa antibiotik dari mikroorganisme seperti bakteri terus menerus dilakukan seiring dengan makin banyaknya penyakit baru yang bermunculan, sehingga dapat menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang sangat potensial untuk dikembangkan menjadi obat (7). Sejauh ini, eksplorasi antibiotik dapat diisolasi dari alam, seperti tanah, jaringan tanaman (endofitik), spons laut dan air.

##### 2.1.1.1 Tanah

Senyawa antibiotik dapat diisolasi dari mikroba yang terdapat pada tanah. Banyaknya infeksi yang terjadi pada manusia salah satunya dikarenakan sering terpapar tanah. Tanah banyak mengandung mikroba yang dapat menyebabkan infeksi, seperti infeksi bakteri. Pemanfaatan bakteri pada tanah yang dapat menghasilkan senyawa antibiotik dilakukan oleh Lihan *et al.*, (2014) yang mengisolasi bakteri dari tanah Hutan Nanga Merit di Sarawak, Borneo, Malaysia. Lihan *et al.*, mendapatkan tujuh isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibiotik. Dari tujuh isolat, terdapat satu isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibiotik yang sangat kuat (14).

#### **2.1.1.2 Jaringan Tanaman**

Bakteri endofit memiliki kemampuan untuk memasuki jaringan tanaman dan membangun hubungan simbiosis dengan inangnya. Beberapa laporan telah meneliti bakteri endofit sebagai agen yang memiliki aktivitas terhadap beragam mikroorganisme patogen. Mohamed *et al.*, (2018) melaporkan bahwa terdapat 56 bakteri yang diisolasi dari tanaman *Glycyrrhiza uralensis* dan memiliki aktivitas antibiotik terhadap empat bakteri uji dengan rentang 8,6 mm sampai 11,6 mm. Isolat bakteri berasal dari enam genus, yaitu *Bacillus*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Phyllobacterium*, *Pantoea* and *Stenotrophomonas* (15).

#### **2.1.1.3 Spons Laut**

Lingkungan laut telah diidentifikasi sebagai sumber yang kaya akan senyawa bioaktif dengan keanekaragaman kimia yang menarik, dan khususnya yang dihasilkan oleh spons laut. Spons laut banyak difokuskan pada kemampuan mereka menghasilkan senyawa metabolit sekunder dengan aktivitas antimikroba. Matobole *et al.*, (2017) telah melakukan isolasi bakteri dari spons laut *Isodictya compressa* and *Higginsia bidentifera* di Algoa Bay, Afrika Selatan. Matobole *et al.*, mendapatkan 29 isolat dan menguji aktivitas antibiotiknya terhadap bakteri patogen *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, dan

*Pseudomonas putida*. Dari 29 isolat uji, didapatkan 17 isolat yang menghambat pertumbuhan bakteri *B. cereus* (16).

#### **2.1.1.4 Air**

##### **1. Air Laut**

Mikroorganisme laut merupakan sumber yang signifikan untuk penemuan dan pengembangan antibiotik baru karena keanekaragaman hayati dan genetiknya yang kaya untuk menghasilkan metabolit yang unik. Telah diakui bahwa banyak spesies baru yang secara taksonomis menjanjikan sebagai sumber senyawa bioaktif baru. Secara khusus, bakteri laut telah menjadi sumber yang kaya akan metabolit sekunder dengan struktur baru dan aktivitas biologis yang sangat baik, termasuk antibiotik. Tortorella *et al.*, (2018) mencatat dari tahun 2009 sampai 2014 ada delapan jenis bakteri yang diisolasi dari air laut dan memiliki aktivitas antibiotik terhadap berbagai bakteri uji yang digunakan (17).

##### **2. Air Danau**

Danau adalah sumber penting air yang mengandung hampir 90% air tawar di seluruh dunia. Air danau yang tergenang berarti dapat menyimpan polutan dari lingkungan dan perlahan akan beredar di sekitar danau, sehingga dapat menyebabkan risiko ekologis yang tinggi untuk ekosistem dan kesehatan manusia. Sebagai lingkungan yang rentan terhadap penumpukan polutan, danau dapat dijadikan sebagai lingkungan untuk pengembangan antibiotik dari komunitas bakteri maupun tanaman airnya. Zothanpuia *et al.*, (2016) telah melakukan isolasi bakteri dari Danau Tamdil dan menguji aktivitas antibiotiknya terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Dari 33 bakteri yang diujikan, terdapat sembilan jenis bakteri dan semuanya memiliki aktivitas antibiotik terhadap bakteri patogen dengan diameter hambat dari 6,05 mm sampai 12,15 mm (17).

## 2.1.2 Penggolongan Antibiotik

### 2.1.2.4.1 Berdasarkan Sifat Toksisitas Selektif

Menurut Katzung (2007), a1. Bakteriostatik

~~Antibiotik berdasarkan sifat toksisitas selektifnya ada yang bersifat bakteriostatik dan yang bersifat bakterisid.~~ Antibiotik bakteriostatik bekerja dengan menghambat replikasi bakteri tanpa membunuh organisme tersebut. Sebagian besar obat bakteriostatik bekerja dengan menghambat sintesis protein. (18) menghambat pertumbuhan mikroba, eContohnya antibiotik yang termasuk ke dalam golongan ini adalah aminoglikosida,  $\beta$ -laktam, fluorokuinolon, glikopeptida, lipopeptida, nitroimidazol dan nitrofurantoin (19).

### 2. Bakterisid

~~Antibiotik bakterisid menyebabkan kematian dan gangguan pada sel bakteri, termasuk obat-obatan yang terutama bekerja di dinding sel (misalnya,  $\beta$ -laktam), membran sel (misalnya, daptomycin) atau DNA bakteri (misalnya, fluoroquinolon) (18).~~ eContohnya Contoh antibiotik lainnya seperti glisilsiklin, linkosamid, makrolida, oxazolidinon, streptogramin, sulphonamide (19). Perbedaan antara bakteriostatik dan bakterisid tidak absolut, dan beberapa agen yang bersifat bakterisid terhadap organisme tertentu mungkin hanya bersifat bakteriostatik terhadap organisme yang lain dan sebaliknya (18). Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM). Antibiotik tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari bakteriostatik menjadi bakterisid bila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi KHM.

### 2.1.2.2 Berdasarkan Mekanisme Kerjanya terhadap Bakteri

Secara umum ada beberapa mekanisme kerja antibiotik (Talaro and Chess, 2008; Madigan and Martinko, 2006; Wright, 2010), yaitu :

1. Menghambat Sintesis Dinding Sel

Dinding sel bakteri berfungsi melindungi membran sitoplasma, memelihara bentuk sel, dan mencegah lisis karena tekanan osmosis. Jika dinding sel rusak atau tidak terbentuk, sel akan lisis atau tidak dapat membelah. Obat-obatan seperti penisilin, karbapenem dan sefalosporin dapat menghambat pembentukan ikatan peptida yang akan menghasilkan peptidoglikan untuk dinding sel bakteri. Sebagian besar antibiotik yang termasuk ke dalam kelas glikopeptida (misalnya, vankomisin) mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan menghambat sintesis peptidoglikan. Mereka menghambat sintesis peptidoglikan dengan mengikat diri ke unit peptidoglikan. (20) ~~Lisisnya sel terjadi karena cairan di sekitar yang hiposmosis berdifusi ke dalam sel menyebabkan pembengkakan dan diikuti lisis. Antibiotik yang bekerja menghambat dinding sel diantaranya adalah golongan penisilin ( $\beta$  laktam), sefalosporin, dan polipeptida.~~

## 2. Menghambat Sintesis Protein

Protein bertanggung jawab atas komposisi struktural, proses metabolisme dan fisiologis, dan respons terhadap kondisi yang merugikan. Sintesis protein pada mikroba berlangsung di ribosom. Jenis dan jumlah protein yang diproduksi oleh bakteri pada waktu tertentu tergantung pada informasi yang terkandung dalam Deoxyribo Nukleic Acid (DNA). Antibiotik menghambat sintesis protein bekerja dengan mengikat ribosom 30S ~~atau~~, 50S atau keduanya. Hambatan sintesis protein menyebabkan gangguan transkripsi mRNA ke dalam protein. Antibiotik yang bekerja dengan mekanisme ini diantaranya golongan aminoglikosida, tetrasiklin, kloramfenikol, dan klindamisin (20).

## 3. Antagonis Asam Folat

Sulfonamida atau sulfa bekerja menghambat sintesis asam folat. Asam folat sangat penting dalam metabolisme asam nukleat dan asam amino. Sulfonamida mengganggu produksi asam nukleat (DNA dan RNA) dan asam amino, karena mereka meniru substrat yang diperlukan untuk metabolisme asam folat, sehingga ~~Bakteri-bakteri~~ tidak dapat mengabsorpsi asam folat dari

makanannya. Maka untuk mencukupi kebutuhannya, asam folat disintesis sendiri menggunakan *para-amino benzoic acid* (PABA), pteridin, dan glutamat. Sulfa secara kimiawi mirip dengan PABA, sehingga dapat menduduki tempat bergabungnya PABA dengan asam folat. Golongan sulfa yang masih sering digunakan adalah kombinasi sulfonamid dan trimetorfin. Kombinasi ini menghasilkan efek yang sinergi. ~~Sulfonamid berkompetisi dengan PABA sedangkan trimetorfin mencegah reduksi dihidrofolat menjadi tetrahidrofolat dengan menghambat enzim dihidrofolat reduktase.~~ (20).

#### 4. Antibiotik yang Mengganggu Biosintesis Asam Nukleat

Proses replikasi DNA di dalam sel merupakan siklus yang sangat penting bagi kehidupan sel. Beberapa jenis antibiotik dapat mengganggu metabolisme asam nukleat tersebut sehingga mempengaruhi keseluruhan fase pertumbuhan sel bakteri. Antibiotik yang termasuk golongan ini antara lain asam nalidiksat dan golongan kuinolon. ~~Antibiotik ini mengganggu sintesis asam nukleat dengan memblokir proses replikasi atau menghentikan transkripsi. Replikasi DNA melibatkan pelepasan struktur heliks ganda secara tradisional, sebuah proses yang difasilitasi oleh enzim helikase. Kelompok antibiotik kuinolon memang mengganggu fungsi enzim helikase sehingga mengganggu pelepasan DNA. Tindakan antibiotik kuinolon ini pada akhirnya menghilangkan proses replikasi~~ (20). ~~Antibiotik ini dapat menghambat enzim DNA girase yang membuat lilitan pada DNA untai ganda.~~

##### 2.1.2.3 Berdasarkan Struktur Kimia Antibiotik

~~Menurut Tjay dan Rahardja (2007), antibiotik berdasarkan struktur kimianya digolongkan menjadi:~~

~~—1. Golongan Beta Laktam~~

~~1.~~

Antibiotik golongan ini dapat berikatan dengan enzim PBP (*penicillin-binding protein*) dan dalam prosesnya akan mengganggu sintesis peptidoglikan yang akan menyebabkan lisis dan kematian sel. Yang termasuk ke dalam antibiotik golongan ini antara lain golongan Penisilin, Sefalosporin, Monobaktam dan Karbapenem (20).

## 2. 2. Golongan Aminoglikosida

Aminoglikosida dihasilkan oleh jenis-jenis fungi, seperti *Streptomyces* dan *Micromonospora*. Semua senyawa dan turunan semi sintetisnya mengandung dua atau tiga gula amino di dalam molekulnya yang saling terikat secara glukosidis. Aminoglikosida memiliki aktivitas antibakteri berspektrum luas. Golongan ini mampu menghambat sintesis protein pada bakteri dengan berikatan pada subunit ribosom. Yang termasuk ke dalam antibiotik golongan ini antara lain Gentamicin, Neomycin, Tobramycin dan Amikacin (20). ~~Spektrum kerjanya luas dan meliputi terutama banyak bakteri *Bacillus* Gram negatif. Golongan aminoglikosida ini bersifat bakterisid berdasarkan dayanya untuk menembus dinding bakteri dan mengikat diri pada ribosom di dalam sel. Contohnya streptomisin, gentamisin, amikasin, neomisin, dan paranomisin.~~

## 3. Golongan Tetrasiklin

Mekanisme kerja golongan ini termasuk bakteriostatik, dengan mengganggu sintesa protein bakteri. Antibiotik golongan ini memiliki spektrum kerja yang luas dan meliputi banyak *Coccus* Gram positif dan Gram negatif serta kebanyakan termasuk *Bacillus*. Antibiotik golongan ini tidak efektif terhadap bakteri *Pseudomonas* dan *Proteus*, tetapi aktif terhadap mikroba khusus *Chlamydia trachomatis* (penyebab penyakit mata trachoma dan penyakit kelamin), dan beberapa protozoa lainnya. Contoh golongan ini adalah tetrasiklin, doksisisiklin, dan monosiklin. Golongan antibiotik ini dikelompokkan ke dalam berbagai generasi berdasarkan metode sintesisnya. Yang diperoleh dengan biosintesis dikategorikan

generasi pertama (Tetracycline, Chlortetracycline, Oxytetracycline dan Demeclocycline). Generasi kedua berasal dari semi-sintesis (Doxycycline, Lymecycline, Meclocycline, Methacycline, Minocycline, dan Rolitetracycline). Generasi ketiga diperoleh dari sintesis total (Tigecycline) (20).

#### 4. Golongan ~~Kloramfenikol~~ Oksazolidinon

Antibiotik ini menghambat sintesis protein dengan berikatan pada bagian P dari subunit ribosom 50S. Antibiotik golongan ini memiliki spektrum kerja yang luas melawan bakteri metisilin dan vankomisin resisten stafilokokus, vankomisin yang resisten terhadap enterococci, penisilin resisten terhadap pneumococci dan anaerob. Linezolid digunakan untuk pengobatan saluran pernapasan, infeksi kulit yang disebabkan oleh bakteri patogen Gram-positif, obat pilihan dalam menangani infeksi bedah karena mereka mudah menembus dan menumpuk di jaringan (20).

~~mempunyai spektrum luas. Berkhasiat bakteristatis terhadap hampir semua bakteri Gram positif dan sejumlah bakteri Gram negatif. Mekanisme kerjanya berdasarkan inhibisi sintesa polipeptida bakteri.~~

#### 5. Golongan Makrolida

Makrolida dapat membunuh atau menghambat mikroorganisme lain dengan cara menghambat sintesis protein bakteri. Golongan ini bekerja bakteristatis terhadap terutama bakteri Gram positif dan spektrum kerjanya mirip Penisilin G. Antibiotik golongan ini memiliki spektrum aktivitas antibiotik yang lebih luas daripada Penisilin dan sering diberikan kepada pasien yang alergi terhadap Penisilin. Mekanisme kerjanya melalui pengikatan reversibel pada ribosom bakteri, sehingga sintesa proteinnya dihambat. Contoh antibiotik golongan ini adalah eritromisin, azitromisin, klaritromisin, dan spiramisin (20).

#### 6. Golongan Kuinolon

Senyawa-senyawa kuinolon dapat mengganggu replikasi dan transkripsi DNA pada bakteri dan berkehasiat-ber sifat bakterisida pada pertumbuhan bakteri, berdasarkan inhibisi terhadap enzim DNA-gyrase bakteri, sehingga sintesis DNA dihindarkan. Golongan ini hanya dapat digunakan pada infeksi saluran kemih (ISK) tanpa komplikasi dan infeksi saluran pernapasan. Contoh antibiotik golongan ini adalah asam nalidiksat, norfloksasin, ciprofloksasin, ofloksasin, levofloxacin dan moksifloksasin (20).

## **2.2 Bakteri**

Bakteri merupakan mikroorganisme prokariotik, paling banyak ditemukan dan paling sederhana. Bakteri tidak memiliki nukleus dan tidak memiliki organel yang kompleks. Kebanyakan prokariota memiliki ukuran kurang dari sepuluh mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) (21).

### **2.2.1 Bentuk Sel Bakteri**

#### **2.2.1.1 Basil**

Basil berbentuk seperti tongkat pendek, agak silindris. Bentuk basil meliputi sebagian besar bakteri. Pada bentuk batang dapat berupa streptobasil (berderet) dan diplobasil (dua-dua) (22).

#### **2.2.1.2 Kokus**

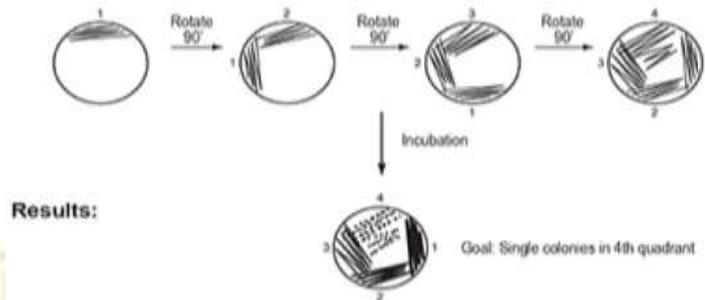
Bentuk kokus adalah bentuk bakteri seperti bola-bola kecil. Golongan tidak sebanyak basil. Pada bentuk kokus, dapat berupa diplokokus (dua-dua), tetrakokus (empat-empat), sarcina (delapan kubus), streptokokus (seperti rantai) dan staphylococcus (bergerombol seperti buah anggur) (22).

#### **2.2.1.3 Spiral**

Bentuk spiral adalah bakteri yang berbentuk spiral atau panjang berbengkok-bengkok. Golongan ini tidak banyak bila dibandingkan dengan basil dan kokus (22).

## 2.2.2 Metode Isolasi Bakteri

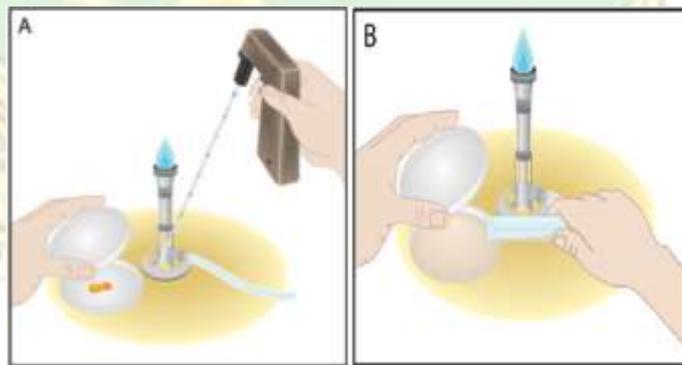
### 2.2.2.1 *Streak Plate*



Gambar 1. Metode *streak-plate* dengan goresan kuadran (23).

Koloni tunggal terdiri dari jutaan sel yang tumbuh. Metode *streak-plate* dirancang untuk mengisolasi koloni dengan pemisahan secara mekanis sederhana dengan penggoresan kuadran pada permukaan agar. Secara teori, semua sel dalam koloni berasal dari bakteri-bakteri tunggal yang tumbuh bersama, dengan demikian disebut sebagai klon, atau sekelompok sel yang identik secara genetis (23).

### 2.2.2.2 *Pour Plate*



Gambar 2. Metode *Pour Plate* (23).

Metode ini sering digunakan untuk menghitung jumlah mikroorganisme yang tumbuh. Sampel dengan volume yang kecil (0.1 sampai 1 ml) ditambahkan ke media agar yang masih cair dan cawan petri steril sebelum ditambahkan agar. ~~memadat~~. Sampel yang digunakan biasanya adalah sampel cair. Proses ini

menghasilkan koloni yang tersebar merata di seluruh medium padat. Metode ini juga biasanya digunakan untuk melihat konsentrasi dari jumlah sampel yang digunakan (23).

### 2.2.2.3 Spread Plate



Gambar 3. Metode Spread Plate menggunakan kaca (23).

Metode ini biasanya digunakan untuk memisahkan mikroorganisme yang terkandung dalam volume sampel yang kecil (0.1 sampai 0.2 ml) dan tersebar di permukaan agar. Selain itu, metode ini juga digunakan untuk menghitung jumlah koloni. Bedanya, metode ini menggunakan kaca untuk meratakan sampel atau suspensi bakteri yang sebelumnya telah diletakkan di permukaan agar (23).

### 2.3.1.3 Berdasarkan Aktivitas

Menurut Katzung (2007), antibiotik berdasarkan aktivitasnya digolongkan menjadi:

#### 1. Antibiotik Spektrum Luas (*Broad Spectrum*)

Contohnya seperti tetrasiklin dan sefalosporin efektif terhadap organisme baik Gram positif maupun Gram negatif. Antibiotik berspektrum luas sering kali dipakai untuk mengobati penyakit infeksi yang belum diidentifikasi dengan pembiakan dan sensitivitas.

#### 2. Antibiotik Spektrum Sempit (*Narrow Spectrum*)

Golongan ini terutama efektif untuk melawan satu jenis organisme. Contohnya penisilin dan eritromisin yang digunakan untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram positif. Antibiotik berspektrum sempit bersifat selektif, maka obat-obat ini lebih aktif dalam melawan organisme tunggal tersebut daripada antibiotik berspektrum luas.

### 2.3 Resistensi

Resistensi merupakan suatu dampak negatif dari pemakaian antibiotik yang irasional, penggunaan antibiotik dengan indikasi yang tidak tepat, dosis yang tidak mencukupi, lama pemakaian yang tidak sesuai, cara pemakaian yang kurang tepat dan pemakaian antibiotik secara berlebihan (4). Menurut Alam *et al.* (2013), resistensi sel bakteri patogen dan virus mengalami peningkatan dan beberapa obat terapi yang sudah ada tidak lagi efektif untuk mengatasinya. Produk alami memiliki potensi sebagai dasar agen terapi untuk permasalahan tersebut (24).

## 2.4 Mikroorganisme Uji

### 2.4.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* yang merupakan anggota dari keluarga bakteri Enterobacteriaceae, adalah komensal yang paling umum menghuni saluran

pencernaan manusia dan hewan, serta salah satu bakteri patogen yang umum.

Bakteri *Escherichia coli* termasuk bakteri basil, mempunyai ukuran panjang 2,0 – 6,0  $\mu\text{m}$  dan lebar 1,1-1,5  $\mu\text{m}$ , tersusun tunggal, berpasangan, dengan flagella peritikus, tidak berkapsul, umumnya mempunyai fimbria dan bersifat motil. *Escherichia coli* tumbuh pada suhu antara 10-40<sup>0</sup>C, dengan suhu optimal 37<sup>0</sup>C. pH optimum untuk pertumbuhan bakteri ini adalah pada 7,0-7,5, pH minimum pada 4,0 dan maksimum pada pH 9,0. ~~Bakteri ini sangat sensitif terhadap panas (Supardi, 1999).~~ *Escherichia coli* adalah bakteri yang paling umum menyebabkan infeksi pada gastrointestinal manusia (25).

#### **2.4.2 *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* adalah bakteri Gram-negatif, berbentuk batang, asporogenous, dan monoflagella. *P. aeruginosa* tumbuh dengan baik pada suhu 25<sup>0</sup>C hingga 37<sup>0</sup>C, dan kemampuannya untuk tumbuh pada 42<sup>0</sup>C membantu membedakannya dari banyak spesies *Pseudomonas* lainnya. *P. aeruginosa* adalah mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk bertahan hidup di bawah berbagai kondisi lingkungan. Bakteri ini tidak hanya menyebabkan penyakit pada tumbuhan dan hewan, tetapi juga pada manusia. ~~(CF)~~ (26). Bakteri *P. aeruginosa* merupakan bakteri yang tersebar luas di lingkungan dan patogen bagi manusia yang menyebabkan penyakit infeksi saluran kemih, infeksi saluran pernapasan dan sepsis (27).

#### **2.4.3 *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* adalah bakteri Gram positif dan jika diamati di bawah mikroskop akan tampak dalam bentuk bulat tunggal atau berpasangan atau berkelompok seperti buah anggur (28). *S. aureus* berdiameter 0,7-1,2 $\mu\text{m}$  tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora dan tidak bergerak. Bakteri ini tumbuh optimum pada suhu 37<sup>0</sup>C. *S. aureus* adalah bakteri patogen yang menyerang manusia. Sekitar 30% dari populasi manusia sudah terinfeksi oleh *S. aureus*. Ciri khas infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* adalah

radang supuratif (bernanah) pada jaringan lokal dan cenderung menjadi abses. *S. aureus* dikenal sebagai bakteri yang paling sering mengkontaminasi luka pasca bedah sehingga menimbulkan komplikasi. Bila terjadi bakteriemia, infeksi dapat bermanifestasi ke berbagai organ (29). Bersamaan dengan itu, *S. aureus* adalah bakteri yang paling umum menyebabkan bakteremia dan endokarditis infeksi, osteoarticular, kulit dan jaringan lunak, dan pleuropulmonary (30).

#### **2.4.4 *Streptococcus mutans***

*S. mutans* adalah bakteri berbentuk kokus dan termasuk Gram positif. Bakteri yang bersifat anaerob fakultatif ini umumnya ditemukan di rongga mulut manusia dan merupakan penyumbang utama kerusakan gigi. Hasil pembusukan dapat sangat mempengaruhi kesehatan individu secara keseluruhan (31). *S. mutans* bersifat mesofilik dan tumbuh pada suhu antara 18-40°C. *S. mutans* adalah mikroorganisme kariogenik yang memecah gula untuk menghasilkan energi dan menciptakan lingkungan asam, yang mendemineralisasi struktur superfisial gigi. *S. mutans* adalah bakteri patogen yang berhubungan dengan karies gigi, karena menurut studi yang dilakukan oleh Seymour *et al.* (2000), diketahui bahwa bakteri ini menyerang saat melakukan perawatan gigi dan perawatan mulut harian yang tidak tuntas (32).

#### **2.5 Fermentasi untuk Produksi Metabolit**

Secara biokimia, fermentasi berarti pembentukan energi melalui katabolisme senyawa organik. Dalam industri modern, fermentasi berarti proses pengubahan bahan dasar tertentu menjadi suatu produk oleh masa sel mikroorganisme. Berdasarkan penerapannya dalam industri komersial, proses fermentasi dikelompokkan menjadi lima tipe, yaitu fermentasi untuk produksi biomasa, fermentasi untuk produksi enzim, fermentasi untuk produksi metabolit, fermentasi untuk produksi produk rekombinan dan fermentasi untuk modifikasi senyawa tertentu (biotransformasi) (33).

Pertumbuhan mikroorganisme dalam biakan mulai saat inokulasi dimulai pada fase lag yaitu masa penyesuaian (adaptasi) yang kemudian disusul oleh fase logaritmik (fase eksponensial) yaitu masa pertumbuhan dengan laju eksponensial atau pertumbuhan vegetatif. Kemudian diikuti dengan fase stasioner dimana pertumbuhan vegetatif terhenti dan kemudian memasuki fase kematian (33).

## **2.6 Danau Biru**

Sawahlunto yang hari jadinya ditetapkan pada tahun 1888 juga dikenal dengan sebutan kota arang, merupakan kota tambang batubara terbesar dan sekaligus tertua di Indonesia (34). Sayangnya, kegiatan penambangan batu bara ilegal tidak dikelola dengan baik, sehingga banyak kegiatan tambang terbuka ilegal yang banyak menimbulkan kerusakan lingkungan.

Sistem penambangan terbuka menyebabkan terbentuknya lubang galian yang sangat dalam dan luas. Hal ini terdapat di Desa Tumpuak Tengah, Kecamatan Talawi, Kota Sawahlunto, akan terlihat lubang bekas galian tambang, sekilas bentuknya seperti kawah besar yang luasnya sekitar hampir satu hektar. Apabila pada musim hujan maka lubang bekas galian tersebut akan terisi air hujan sehingga lubang tersebut seolah-olah seperti danau. Salah satu lubang bekas galian tambang batubara di Sawahlunto tersebut berisi air yang terlihat berwarna biru dan warga sekitar menyebutnya dengan Danau Biru yang saat ini dijadikan objek wisata di Kota Sawahlunto (35).

Kondisi geologi pada Danau Biru ini tersusun atas litologi yang dominan yaitu batu lempung, batu pasir halus dan terdapat adanya batubara. Berdasarkan keberadaannya, Danau Biru tersebut terbentuk di lahan galian bekas tambang batubara dengan kedalaman kurang lebih 30 m. Air yang terkandung pada danau tersebut berasal dari air hujan dan air permukaan, kemudian terakumulasi dalam suatu cekungan atau wadah yang sekarang dikenal dengan sebutan Danau Biru. Secara morfologi Danau Biru berada pada daerah perbukitan dengan elevasi 425 mdpl (35).

Masyarakat di sekitar Danau Biru ada yang menggunakan air Danau Biru tersebut untuk kebutuhan sehari-hari seperti air minum, tanpa mengetahui

keamanan dan kandungan air yang digunakan. Berikut data kandungan air Danau Biru dan persyaratan kualitas air minum.

**Table-Tabel 1.** Hasil analisis geokimia pada air asam tambang di Danau Biru (35).

Parameter	Unit	Result
pH	-	<6,4
Besi (Fe)	mg/L	0,87
Klorida (Cl)	mg/L	19,85
Mangan (Mn)	mg/L	3,11
Sulfat (SO <sub>4</sub> )	mg/L	30,85
Tembaga (Cu)	mg/L	2,03
Aluminium (Al)	mg/L	0,78

**Tabel 52.** Persyaratan kualitas air minum menurut Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 492 Tahun 2010 (36).

Parameter	Satuan	Kadar maksimum yang diperbolehkan
pH	-	6,5-8,5
Besi (Fe)	mg/L	0,3
Klorida (Cl)	mg/L	250
Mangan (Mn)	mg/L	0,4
Sulfat (SO <sub>4</sub> )	mg/L	250
Tembaga (Cu)	mg/L	2
Aluminium (Al)	mg/L	0,2

## 2.7 Metode Pengujian Aktivitas Antibiotik dengan Metode Difusi

Pada prosedur ini, kertas cakram ~~(kira-kira yang~~ berdiameter 6 mm), ~~dan~~ berisi senyawa uji ~~yang,~~ ditempatkan pada permukaan ~~agar di dalam cawan petri~~ yang sebelumnya telah diinokulasi ~~dengan-dengan mikroba-bakteri~~ uji. Agen

~~antimikroba—antibiotik~~ akan berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan dari ~~mikroba-bakteri~~ uji. Cawan petri diinkubasi selama 24 jam dan zona inhibisi diukur. ~~Pada metode silinder, silinder dari stainless steel atau porcelin dengan ukuran yang seragam (biasanya 8 mm x 6 mm x 10 mm) ditempatkan diatas agar terinokulasi didalam cawan petri, dan diisi dengan sampel dan standar. Setelah diinkubasi, silinder dipindahkan dan zona inhibisi yang terbentuk diukur~~ (37). Apabila diameter hambat ~~aktivitas antibiotik mencapai at >>1220~~ mm, maka dikategorikan bersifat antibiotik yang sangat pada tingkat sensitivitas tinggi kuat. Kategori tingkat antibiotik kuat diberikan apabila senyawa antibiotik mampu memberikan diameter hambat 10-20 mm. Kategori tingkat antibiotik sensitivitas sedang diberikan apabila senyawa antibiotik mampu memberikan diameter hambat sekitar 9-125-10 mm. Kategori tingkat sensitivitas rendah-lemah apabila diameter berkisar antara 6-9 mm, dan resisten apabila <6<5 mm (tidak memiliki diameter hambat) (38).

## 2.8 Ekstraksi dengan Cara Maserasi

Ekstraksi adalah suatu proses penarikan senyawa-senyawa kimia dari hewan, tumbuhan, dan organisme lainnya menggunakan pelarut tertentu. Teknik yang umum digunakan dalam proses ekstraksi adalah maserasi, perkolasi, sokletasi, ~~perebusan dan lain-lain~~ infusi dan lain-lain. Tujuan ekstraksi adalah untuk memisahkan metabolit yang larut dan meninggalkan metabolit atau seluler yang tidak larut (residu) (39).

Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. Secara teknologi maserasi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi dilakukan dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan atau kamar (40). Maserasi merupakan suatu proses penyarian secara sederhana dengan merendam bagian tumbuhan, hewan, dan

organisme lain dengan pelarut dalam jangka waktu tertentu. Pelarut akan menembus rongga sel yang memiliki zat aktif. Adanya perbedaan konsentrasi antara di luar dan di dalam sel menyebabkan larutan yang terpekat di desak keluar sel. Peristiwa tersebut terjadi berulang kali sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan zat aktif dalam sel dengan larutan di luar dan di dalam sel. Keuntungan dari metoda maserasi yaitu alat dan teknik pengerjaan sederhana serta dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat termolabil (Harborne, 1987).

Keuntungan cara ini yaitu mudah dan tidak perlu pemanasan sehingga kecil kemungkinan senyawa menjadi rusak atau terurai. Pemilihan pelarut berdasarkan kelarutan dan polaritasnya memudahkan pemisahan senyawa dalam sampel. Pengerjaan metode maserasi yang lama selama maserasi memungkinkan banyak senyawa yang akan terekstraksi. (41) Kerugiannya adalah pengerjaannya lama dan penyarian kurang sempurna (40). Perkolasi merupakan teknik penyarian senyawa kimia dengan menggunakan alat perkolator. Prinsipnya hampir sama dengan teknik maserasi. Perbedaannya adalah dalam hal pelarut yang digunakan. Pada perkolasi, sampel diletakkan pada alat perkolator dan pelarut mengalir secara kontinu. Proses ekstraksi dihentikan apabila larutan yang keluar dari alat perkolator sudah tidak berwarna lagi atau sudah tidak terdeteksi lagi dengan pemeriksaan golongan senyawa yang diinginkan. Keuntungan menggunakan metode ini adalah proses ekstraksi dan fraksinasi dapat langsung dilakukan karena menggunakan tipe pelarut yang sesuai kepolarannya. Kelemahan perkolasi ini adalah pelarut yang digunakan cukup banyak (Harborne, 1987)

Sokletasi adalah proses penyarian senyawa kimia menggunakan pelarut organik menggunakan alat soklet. Pada sokletasi pelarut dan sampel diletakkan secara terpisah. Prinsip metode ini adalah penyarian berulang dengan menggunakan pelarut yang relatif lebih sedikit. Namun, kelemahan cara ini adalah tidak bisa digunakan untuk senyawa senyawa yang bersifat termolabil (Harborne, 1987).

— Destilasi merupakan proses penyarian untuk pemisahan zat yang mudah menguap seperti minyak atsiri. Proses isolasi dapat dilakukan dengan cara destilasi baik destilasi normal pada suhu dan tekanan udara normal maupun secara *in vacuo* (dengan tekanan rendah sehingga pelarut akan menguap di bawah titik didihnya) (Harborne, 1987).

— Perebusan merupakan teknik penyarian menggunakan pelarut air. Pada proses ini sampel direndam dengan pelarut (air) kemudian dipanaskan sampai mendidih. Metode perebusan merupakan metode tradisional dan jarang digunakan pada saat sekarang ini karena proses penyarian kurang sempurna dan tidak dapat dilakukan untuk senyawa termolabil (Harborne, 19

## **2.9 Metode Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis**

### **2.9.1 Kromatografi Lapis Tipis**

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan teknik adsorpsi dimana fase gerak naik ke lapisan tipis fase diam yang dilapisi ke pelat penopang. Kromatografi lapis tipis adalah teknik yang cepat, sensitif, dan murah yang hanya membutuhkan beberapa mikrogram sampel untuk mendapatkan analisis yang berhasil (42).

Kromatografi lapis tipis umumnya digunakan untuk (42) :

- a. menentukan jumlah komponen dalam suatu campuran
- b. memverifikasi identitas dan kemurnian suatu senyawa
- c. memantau perkembangan suatu reaksi
- d. menentukan komposisi pelarut untuk pemisahan
- a.e. menganalisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom Kromatografi

lapis tipis (KLT) merupakan salah satu metoda pemisahan senyawa yang berguna untuk melihat bercak yang naik pada plat KLT. Biasanya KLT dilakukan dengan cara menotolkan ekstrak dan fraksi pada plat KLT kemudian ekstrak naik dalam suatu bejana yang dindingnya dilapisi kertas saring sehingga atmosfer di dalam bejana jenuh dengan fase pelarut dan menghasilkan bercak lebih bundar dan lebih baik. Hasil KLT ini dapat dilihat melalui harga  $R_f$  (faktor retensi). Angka  $R_f$  bernilai antara 0,00 dan 1,00 dan hanya dapat ditentukan dua desimal (Gritter, *et al.*, 1991).

### **2.9.1.1 Fase Diam KLT**

Fase diam KLT dengan bahan aluminium lebih disukai daripada bahan lain untuk pelat KLT. Dibandingkan dengan bahan lain, aluminium ini lebih tipis, ringan, dan mudah digunakan. Pelat ini dapat dengan mudah dipotong sesuai dengan dimensi yang diinginkan dengan gunting dan dapat disimpan dalam buku catatan laboratorium. Pelat aluminium memiliki lapisan adsorben yang kuat dan baik untuk digunakan dengan eluen yang mengandung konsentrasi air yang tinggi. Lapisan yang paling umum digunakan sebagai adsorben dalam KLT adalah silika. Selain itu, penggunaan selulosa, poliamida, dan florisil (magnesium silikat) juga digunakan. Dengan asumsi bahwa adsorben yang digunakan polar (silika gel), semakin banyak senyawa polar, maka proses elusi akan lebih lambat dan semakin banyak senyawa nonpolar, maka proses elusi akan lebih cepat (42).

### **2.9.1.2 Fase Gerak pada KLT**

Menemukan pelarut yang cocok biasanya merupakan bagian paling sulit dari eksperimen menggunakan KLT. Pelarut adalah faktor dengan pengaruh terbesar pada KLT. Dalam beberapa kasus, pelarut terdiri dari satu komponen hingga gabungan dari beberapa komponen. Pelarut yang digunakan harus merupakan sistem yang homogen tanpa ada tanda kekeruhan (42).

Jika sampel yang digunakan belum pernah dilaporkan atau ditentukan sebelumnya, mulailah dengan pelarut yang kurang polar dan kombinasikan, seperti heksana dengan etil asetat dan amati pemisahannya. Jika komponen senyawa tidak bergerak terlalu jauh, coba tambahkan volume pelarut polar yang lebih besar atau rasio yang lebih tinggi dari sebelumnya. Selalu bandingkan pemisahan dengan pelat sebelumnya (42).

Fase gerak yang digunakan pada KLT dapat dipilih dari studi pustaka, tetapi lebih sering dengan mencoba-coba karena waktu yang diperlukan hanya sebentar. Sistem yang paling sederhana ialah campuran 2 pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal. Daya elusi fase gerak harus diatur

sedemikian rupa sehingga harga  $R_f$  terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan. Untuk pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi pelarut yang berarti juga menentukan nilai  $R_f$  (43).

### **2.9.1.3 Aplikasi Penotolan Sampel**

Pemisahan pada kromatografi lapis tipis yang optimal akan diperoleh hanya jika menotolkan sampel dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Sebagaimana dalam prosedur kromatografi yang lain, jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka akan menurunkan resolusi. Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak yang menyebar dan bercak-noda ganda (43).

### **2.9.1.4 Pengembangan (Elusi KLT)**

Bila sampel telah ditotolkan maka tahap selanjutnya adalah mengembangkan sampel tersebut dalam suatu bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhi dengan uap fase gerak. Tepi bagian bawah lempeng lapis tipis yang telah ditotoli sampel dicelupkan ke dalam fase gerak kurang lebih 0,5-1 cm. Tinggi fase gerak dalam bejana harus dibawah lempeng yang berisis totolan sampel. Selama proses elusi bejana kromatografi harus tertutup rapat dan sedapat mungkin volume fase gerak sedikit mungkin, tetapi mampu mengelusi lempeng sampai ketinggian lempeng yang ditentukan (43).

### **2.9.1.5 Deteksi Bercak Noda KLT**

Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Untuk penentuannya dapat dilakukan secara kimia, fisika, maupun biologi. Cara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan hingga bercak menjadi jelas. Cara fisika yang dapat digunakan untuk menampakan bercak adalah dengan pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet (44).

Mengamati lempeng dibawah lampu UV yang dipasang panjang

gelombang emisi 254 nm atau 366 nm untuk menampakkan noda sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi seragam. Lempeng yang akan digunakan dapat dibeli dalam bentuk lempeng yang sudah diberi dengan senyawa fluoresensi yang tidak larut yang dimasukkan kedalam fase diam untuk memberikan dasar fluoresensi (43).



## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan dari bulan Oktober 2018 sampai bulan Februari 2019 di Laboratorium Biota Sumatera, Universitas Andalas, Padang dan Laboratorium Balai Penyidik dan Pengujian Veteriner Regional II Bukittinggi, Provinsi Sumatera Barat.

### 3.2 Metoda Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dan analisis data dilakukan secara deskriptif. Pengambilan sampel dilakukan secara purposive sampling pada bagian sisi Danau Biru. Sampel yang digunakan terdiri dari enam sampel airtitik pengambilan sampel yang diambil dari air Danau Biru, Kota Sawahlunto, Sumatera Barat.

### 3.3 Alat dan Bahan

#### 3.3.1 Alat

Alat yang dibutuhkan untuk pengerjaan ini adalah *Laminar Air Flow* (LAF), vortex (Iwaki®), Erlenmeyer (Pyrex®), gelas ukur (Pyrex®), tabung reaksi (Pyrex®), pipet mikro (Gilson®), pipet tetes, cawan Petri (Normax®), pinset, timbangan analitik, kapas, kain kasa, benang jagung, kaca objek, vial, spiritus

(Brataco®), jarum ose, pembolong kertas, kertas perkamen, batang pengaduk, botol semprot, aluminium foil, *plastic wrap*, autoklaf, inkubator, *shaker incubator*, jangka sorong, corong pisah (Iwaki®), botol plastik, kromatografi lapis tipis (Merck®), *rotary evaporator*, bejana kromatografi lapis tipis (chamber), *hot plate*, sentrifus, *spatula*, lampu UV, tabung effendroft, *micropipet*, *microtips*, *cotton bath*, kertas saring.-

### 3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel uji dari enam titik pengambilan, media Nutrien Agar (NA) (Merck®), media Nutrient Broth (NB) (Merck®), aquadest steril, metanol, etil asetat, NaCl 0,85% steril, alkohol 70% (Brataco®), larutan standar Mc Farland 0.5%, medium TSIA (Triple Sugar Iron Agar), paraffin cair, kristal violet, yodium lugol, safranin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, medium SIM (Sulfida Indol Motility), dimethyl amino benzaldehyde, medium glukosa, pepton, fosfat, methyl red, α-naphtol, KOH, medium SCA (Simmon Citrate Agar), medium Hugh Leifson, agar urea, gelatin, medium khusus asam amino, indikator BTB (*Brom Thymol Blue*), phenol red, medium KCN, asam sulfanilat, α-naftalamin, laktosa, glukosa, sukrosa, manitol, medium phenylalanin, penampak noda anisaldehid sulfuric acid (ANS), antibiotika amoxicillin, Mannitol Salt Agar (MSA) (Merck®), Tryptone Soya Agar (TSA) (Merck®), *Cetrimide Agar* (Merck®), Endo Agar (Himedia®), Eosin Methylen Blue Agar (EMBA) (Conda®). Mikroba uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

## 3.4 Prosedur Penelitian

### 3.4.1-1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat dan media yang digunakan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan. Cawan petri, gelas ukur, tabung reaksi, dan labu erlenmeyer ditutup mulutnya dengan kapas dan kain kasa. Kemudian semua alat kaca dan media

disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Pinset dan jarum ose disterilkan dengan cara *flambier* pada lampu spiritus. *Laminar Air Flow* (LAF) disterilkan dengan cara menyemprotkan dan menyalakan lampu ultravioletnya selama 15 menit—(Hadioetomo, 1990). Botol untuk pengambilan sampel di sterilkan dengan cara dibilas dengan alkohol 70%. Setelah kering, disinari dengan sinar UV 265 nm.

### **3.4.1 Pengambilan Sampel**

a. Sampel dalam bentuk air dari Danau Biru ini diambil dengan menggunakan botol plastik steril pada enam titik di sekitar danau dengan jarak pengambilan setiap titik + 5 meter. Sampel diambil sebanyak 500 ml pada setiap titik.

### **3.4.2-3 Pembuatan Medium dan Penampak Noda**

#### **3.4.3.1 Nutrien Agar (NA) (Merck®)**

Medium NA ditimbang sebanyak 20 g, lalu dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 1000 ml aquadest steril. Kemudian campuran ini dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan batang pengaduk sampai homogen dan mendidih. Selanjutnya, medium disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit.

#### **3.4.3.2 Nutrien Broth (NB) (Merck®)**

Medium NB ditimbang sebanyak 8 g, lalu dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 1000 ml aquadest steril. Kemudian campuran ini dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan batang pengaduk sampai homogen dan mendidih. Selanjutnya, medium disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit.

#### **3.4.3.3 Mannitol Salt Agar (Merck®)**

Ditimbang media Mannitol Salt Agar (MSA) sebanyak 108.0 g dan tambahkan 1000 ml aquadest. Panaskan medium dan sterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit.

#### **3.4.3.4 Tryptone Soya Agar (Merck®)**

Ditimbang media Tryptone Soya Agar (TSA) sebanyak 40.0 g dan tambahkan 1000 ml aquadest. Panaskan medium dan sterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit.

#### **3.4.3.5 Cetrinide Agar (Merck®)**

Ditimbang media *Cetrinide Agar* sebanyak 45.3 g dan tambahkan 1000 ml aquadest. Panaskan medium dan sterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit.

#### **3.4.3.6 Endo Agar (Himedia®)**

Ditimbang media Endo Agar sebanyak 41.5 g dan tambahkan 1000 ml aquadest. Panaskan medium dan sterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit.

#### **3.4.3.7 Eosin Methylen Blue Agar (Conda®)**

Ditimbang media Eosin Methylen Blue Agar (EMBA) sebanyak 36.0 g dan tambahkan 1000 ml aquadest. Panaskan medium dan sterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit.

#### **3.4.3.8 Anisaldehyd Sulfuric Acid (ANS)**

Ambil sebanyak 98 ml ANS induk, lalu ditambahkan 2 ml asam sulfat pekat yang dikerjakan di dalam lemari asam.

### **3.4.3-4 Pemiakan Bakteri Uji**

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Bakteri *E. coli* dan *P. aeruginosa* dipilih untuk mewakili bakteri Gram negatif. Bakteri *S. aureus* dan *S. mutans* dipilih untuk mewakili bakteri Gram positif. Semua bakteri uji didapatkan dari stok murni di Laboratorium Bioteknologi Labor Biota Sumatera Universitas Andalas, Padang. Stok murni tersebut dibiakan ke dalam agar NA miring steril yang dilakukan dengan cara menginokulasikan sebanyak satu jarum ose biakan bakteri dari stok bakteri murni ke dalam agar NA miring steril. Lalu inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

### **3.4.4-5 Isolasi dan Pemurnian Bakteri**

#### **3.4.4-5.1 Isolasi Bakteri**

Metode yang digunakan adalah metode isolasi dengan teknik *pour-plate*. Sejumlah 1,0 ml sampel dituangkan secara aseptik ke dalam cawan Petri yang kosong dan steril. Medium agar-NA steril didinginkan hingga suhu sekitar 48°C, kemudian dituangkan ke dalam cawan Petri yang telah terisi sampel. Cawan Petri diputar untuk menghomogenkan sampel dan medium agar. Agar dibiarkan memadat selama sekitar 30 menit kemudian cawan Petri diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam (23).

#### **3.4.4-5.2 Pemurnian Bakteri**

Isolat bakteri yang berbeda diinokulasikan pada medium NA steril. Biakan di inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Koloni tunggal bakteri di inokulasikan pada tabung reaksi yang berisi medium NA sebagai biakan miring. Masing-masing tabung reaksi diberi label (45).

### **3.4.5-6 Pengujian Konfirmasi Bakteri Uji yang Digunakan**

#### **3.4.6.1 *S. aureus* ATCC 25923 dengan Mannitol Salt Agar**

Sebanyak  $\pm$  15 ml medium MSA steril dituangkan ke dalam cawan Petri steril dan tunggu sampai medium memadat. Setelah itu, bakteri *S. aureus* di inokulasikan ke permukaan medium dengan metode *streak plate*. Kemudian inkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.

#### **3.4.6.2 *S. mutans* ATCC 25175 dengan Tryptone Soya Agar**

Sebanyak  $\pm$  15 ml medium TSA steril dituangkan ke dalam cawan Petri steril dan tunggu sampai medium memadat. Setelah itu, bakteri *S. mutans* di inokulasikan ke permukaan medium dengan metode *streak plate*. Kemudian inkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.

#### **3.4.6.3 *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan Cefrimide Agar**

Sebanyak  $\pm$  15 ml medium Cefrimide Agar steril dituangkan ke dalam cawan Petri steril dan tunggu sampai medium memadat. Setelah itu, bakteri *P. aeruginosa* di inokulasikan ke permukaan medium dengan metode *streak plate*. Kemudian inkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.

#### **3.4.6.4 *E. coli* ATCC 25922 dengan Endo Agar dan Eosin Methylen Blue Agar**

Sebanyak  $\pm$  15 ml medium Endo Agar steril dituangkan ke dalam cawan Petri steril dan tunggu sampai medium memadat. Setelah itu, bakteri *E. coli* di inokulasikan ke permukaan medium dengan metode *streak plate*. Kemudian inkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.

Sebanyak  $\pm$  15 ml medium EMBA steril dituangkan ke dalam cawan Petri steril dan tunggu sampai medium memadat. Setelah itu, bakteri *E. coli* di inokulasikan ke permukaan medium dengan metode *streak plate*. Kemudian inkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.

### 3.4.7 Produksi Antibiotik dari Isolat Bakteri

#### 3.4.57.1 Pembuatan Suspensi Bakteri

Sebanyak 1-2 jarum ose dari isolat bakteri diinokulasikan pada 10 ml NaCl 0,85% yang sudah disterilkan. Selanjutnya larutan tersebut di vortex sehingga terbentuk suspensi bakteri keruh yang dibandingkan dengan Mc Farland 0.5%.

#### 3.4.57.2 Produksi Antibiotik

Sebanyak 90 ml media NB steril dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 ml yang telah disterilkan. Suspensi bakteri yang sudah dibuat sebelumnya diinokulasikan sebanyak 10 ml pada medium NB, kemudian diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu kamar selama 48 jam dengan pencuplikan dilakukan pada waktu 24, 36, dan 48 jam. Selanjutnya medium produksi disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh diuji potensi antibiotiknya (46).

#### 3.4.57.3 Uji Aktivitas Antibiotik

Pengujian aktivitas antibiotik dari masing-masing bakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar menggunakan kertas cakram. Masing-masing medium NA steril yang telah padat di dalam *Petri dish*, sebanyak 100 µl dari suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 ~~*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175~~ digoreskan secara merata dengan metode swab pada permukaan media NA. Kemudian kertas cakram steril diletakkan pada permukaan medium NA yang telah digores bakteri uji. Cairan supernatan hasil produksi antibiotik diambil sebanyak 10 µl kemudian diteteskan di atas kertas cakram. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Diamati zona bening yang muncul setelah diinkubasi (47).

### **3.4.6.8 Karakterisasi Isolat Bakteri Penghasil Antibiotik**

#### **3.4.68.1 Pengamatan Makroskopis**

Pengamatan makroskopis dilakukan dengan pengamatan visual dan mengamati beberapa parameter, yaitu yang pertama berdasarkan bentuk koloni, dapat berupa *circular* (berbentuk koloni bulat tidak putus-putus atau beraturan), *irregular* (berlekuk atau tidak beraturan) ~~dan~~, *rhizoid* ~~dan~~ *spindle*. Parameter yang kedua berdasarkan warna. Ketiga berdasarkan garis pinggir koloni bakteri yaitu berupa *entire* (rata), *lobate*, *undulate* (berombak atau keriting), *serrate* (bergerigi), dan *filamentous*. Keempat berdasarkan tekstur permukaan koloni bakteri. Kelima adalah elevasi berupa *flat*

(datar), *convex* (cembung), *raised*, *umbonate* (48).

#### **3.4.68.2 Pengamatan Mikroskopis**

Tahapannya adalah apusan tipis dari masing-masing isolat murni yang berumur 24 jam disiapkan pada kaca objek yang bersih. Satu ose isolat yang murni dioleskan tipis pada kaca objek. Selanjutnya diwarnai dengan penambahan larutan kristal violet selama 60 detik dan dibilas dengan air. Apusan tadi ditetesi dengan yodium Lugol selama 30 detik dan dibilas dengan air, warna dihilangkan dengan alkohol 70% selama 15 detik dan dibilas dengan air. Kemudian tetesi larutan Safranin selama 60 detik dan dibilas dengan air, kemudian dibiarkan kering. Apusan dipasang pada mikroskop dan diamati. Sel Gram negatif terlihat berwarna merah jambu atau merah sementara sel Gram positif terlihat berwarna ungu (48).

#### **3.4.68.3 Uji Biokimia**

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

Sebanyak satu ose inokulum bakteri diinokulasikan pada medium TSIA steril yang dimiringkan dan telah memadat, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil uji berwarna kuning menunjukkan produksi asam (49).

## 2. Uji Pembentukan H<sub>2</sub>S (Hidrogen Sulfida)

Sebanyak satu ose inokulum bakteri diinokulasikan pada medium TSIA steril yang dimiringkan dan telah memadat dengan cara digores pada permukaan agar, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil dinyatakan positif jika terbentuk endapan hitam pada daerah bekas inokulasi dan dinyatakan negatif apabila tidak terbentuk endapan hitam (49).

## 3. Uji Oksidasi Fermentasi (OF)

Pada uji oksidasi sebanyak satu ose inokulum bakteri diinokulasikan pada medium Hugh Leifson steril dengan indikator BTB (*Brom Thymol Blue*), lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil uji dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna medium dari hijau menjadi kuning dan dinyatakan negatif apabila medium tetap berwarna hijau- (48). ~~Sedangkan pada~~

Pada pengujian fermentasi, ~~medium Hugh Leifson~~ medium steril dengan indikator BTB (*Brom Thymol Blue*) ditutup dengan parafin cair. Sebanyak satu ose inokulum bakteri diinokulasikan pada medium, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil uji dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna medium dari hijau menjadi kuning dan dinyatakan negatif apabila medium tetap berwarna hijau (48).

## 4. Uji Oksidase

Uji oksidase dilakukan dengan menggunakan pereaksi oksidase H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pereaksi ini dioleskan pada kertas saring dan diletakkan di dalam *Petri dish*. Kemudian diambil sebanyak satu ose bakteri dan dioleskan pada apusan pereaksi oksidase pada kertas saring yang telah dibuat sebelumnya. Hasil uji positif apabila apusan pereaksi oksidase yang sebelumnya berwarna merah muda berubah menjadi ungu tua dan dinyatakan negatif apabila apusan tidak berwarna (49).

## 5. Uji Nitrat

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium NB steril, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah selesai diinkubasi, ditetesi dengan reagen pereaksi larutan ~~A dan larutan Basam sulfanilat dan  $\alpha$ -naftalamin~~ ke dalam medium tersebut dan dilihat perubahan warna yang terjadi. Hasil uji dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna medium dari kuning menjadi merah dan dinyatakan negatif apabila medium tetap berwarna kuning (49).

#### 6. Uji Katalase

Satu tetes larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% ditetesi pada kaca objek. Satu ose isolat bakteri diambil, kemudian dipindahkan ke atas kaca objek dan dicampurkan. Adanya gelembung menunjukkan positif adanya enzim katalase (49).

#### 7. Uji Indol

Sebanyak satu ose inokulum bakteri diinokulasikan pada medium SIM steril kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah selesai diinkubasi, lalu ditambahkan reagen dimethyl\_ amino\_ benzaldehyde (reagen Kovacs). Warna merah atau merah-violet di permukaan atas tabung menunjukkan hasil positif sementara warna kuning menunjukkan hasil negatif (49).

#### 8. Uji Methyl Red (MR)

Pada pengujian MR, sebanyak satu ose inokulum bakteri diinokulasikan pada medium steril yang berisi glukosa, pepton, fosfat, ~~(1 gram glukosa, 0,5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5% pepton dan 100 mL air suling)~~, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah selesai diinkubasi, ditetesi dengan reagen metyhl red ke dalam medium tersebut dan dilihat perubahan warna yang terjadi. Hasil uji dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna medium dari kuning menjadi merah. Dinyatakan negatif apabila medium tetap berwarna kuning (49).

## 9. Uji Voges Praskauer (VP)

Pada pengujian VP, sebanyak satu ose inokulum bakteri diinokulasikan pada medium steril yang berisi glukosa, pepton, fosfat, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah selesai diinkubasi, ditetesi dengan  $\alpha$ -naphhtol dan Kalium hidroksida dan dilihat perubahan warna yang terjadi. Hasil uji dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna medium dari kuning menjadi merah. Dinyatakan negatif apabila medium tetap berwarna kuning (49).

## ~~10. Uji Fermentasi Karbohidrat (Laktosa, Glukosa, Sukrosa, dan Mannitol)~~

~~Sebanyak satu jarum inokulum bakteri diinokulasikan pada medium yang telah memadat, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil uji dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna medium dari hijau menjadi kuning dan dinyatakan negatif apabila medium tetap berwarna hijau (Cappuchino dan Sherman, 2005).~~

## ~~11. Uji Sitrat~~

~~Satu ose inokulum isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium *Simmon Citrat Agar* (SCA) steril yang berisi agar sitrat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif apabila medium berubah dari hijau menjadi biru dan hasil negatif apabila medium tetap berwarna hijau (49).~~

## ~~12. Uji Urea~~

~~Sebanyak satu ose inokulum isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium agar urea steril yang juga berisi indikator phenol red dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif apabila medium berubah dari kuning menjadi merah keunguan dan hasil negatif apabila medium tetap berwarna kuning (49).~~

## ~~13. Uji Motilitas~~

Jarum steril digunakan untuk mengambil isolat dan ditusuk ke medium SIM steril dalam tabung reaksi. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Bakteri non-motil memiliki pertumbuhan terbatas pada garis tusuk tanpa menyebar ke daerah sekitarnya sementara bakteri motil memberikan pertumbuhan dan menyebar di permukaan (49).

#### 14.13. Uji Gelatin

Sebanyak satu ose inokulum bakteri diinokulasikan pada media yang berisi gelatin steril yang telah memadat. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji dinyatakan positif apabila isolat bakteri mampu menghasilkan daerah bening di sekitar medium dan hasil negatif apabila tidak terbentuk daerah bening di sekitar medium (48).

#### 14. Uji Fermentasi Karbohidrat (Laktosa, Glukosa, Sukrosa, dan Mannitol)

Sebanyak satu ose inokulum bakteri diinokulasikan pada medium yang masing-masing berisi larutan gula dan indikator BTB steril yang telah memadat, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil uji dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna medium dari hijau menjadi kuning dan dinyatakan negatif apabila medium tetap berwarna hijau (49).

#### 14.15. Uji Pembentukan Gas

Uji pembentukan gas dilakukan dengan menanamkan satu ose inokulum pada medium TSIA steril. Bila medium pada tabung reaksi terlihat terangkat setelah diinkubasi selama 24 jam, hal ini menunjukkan bakteri tersebut menghasilkan gas, maka uji dianggap positif dan bila tidak maka uji dianggap negatif (49).

#### 14.15. Uji Reaksi Dekarboksilasi (Lysin, Ornithin, Arginin)

Satu ose inokulum bakteri diinokulasikan pada sederetan medium khusus asam amino (lysine, ornithine, dan arginin) yang berwarna ungu. Apabila terbentuk warna kuning, berarti bakteri mampu mendekarboksilasi asam amino (positif), apabila tidak terjadi perubahan warna, maka bakteri tidak mampu mendekarboksilasi asam amino (50).

#### 1717. Uji KCN

Satu ose inokulum bakteri diinokulasi pada medium KCN steril yang tidak berwarna dan diinkubasi selama 24 jam. Apabila medium menjadi keruh, berarti bakteri dapat tumbuh pada medium KCN (positif), sebaliknya apabila tidak terjadi kekeruhan maka bakteri tersebut tidak dapat hidup pada medium KCN (51).

#### 1818. Uji Fenilalanin

Satu ose inokulum bakteri diinokulasi pada medium phenilalanin steril yang berwarna putih. Kemudian ditambahkan 0,2 ml  $\text{FeCl}_3$ . Apabila terbentuk warna hijau, berarti bakteri mampu mendeaminisasi phenilalanin (positif), apabila tidak terbentuk warna hijau, bakteri tidak dapat mendeaminisasi phenilalanin (negatif) (51).

#### 1919. Uji Arabinose dan Xylose

Dilakukan penanaman bakteri pada sederetan media khusus yang berisi asam amino arabinose dan xylose dan diinkubasi selama 24 jam. Dilihat reaksinya dimana warna asli media adalah biru, apabila terjadi perubahan warna menjadi kuning berarti reaksi positif dan jika tidak berarti reaksi negatif (51).

#### 2020. Uji Aesculin

Satu ose inokulum bakteri diinokulasikan pada medium khusus yang berisi asam amino aesculin steril berwarna ungu dan diinkubasi selama 24 jam. Apabila terbentuk warna kuning berarti reaksi positif dan jika tidak berarti reaksi negatif (52).

### 3.4.7-9 Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder

Hasil Bagian supernatan dari hasil produksi antibiotik yang memiliki aktivitas terbaik, diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:1 selama tiga hari. Selanjutnya bagian etil asetat dipisahkan dari media produksi menggunakan corong pisah. Pelarut etil asetat kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak etil asetat (53).

### 3.4.8-10 Melihat Profil Metabolit Sekunder dari Bakteri menggunakan Kromatografi Lapis Tipis

Pemeriksaan KLT dilakukan untuk menunjukkan bercak dari senyawa hasil ekstraksi dengan fasa gerak yang sesuai. Sebagai penampak bercak digunakan lampu UV254 nm, UV366 nm dan penampak noda *anisaldehid sulfuric acid* (ANS).

### 3.5 Analisis Data

Data yang didapatkan dianalisis secara deskriptif, kemudian data disajikan dalam bentuk tabel.

## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian isolasi bakteri dilakukan dari air Danau Biru asal Kota Sawahlunto sebagai sampel yang akan diteliti. Alasan peneliti memilih sampel ini karena belum ada yang meneliti tentang potensi bakteri pada air Danau Biru. Selain itu, Danau Biru merupakan tempat yang unik dari segi lokasi, warna, pH, dan kandungan logam yang terdapat di dalamnya. Danau Biru berlokasi di kawasan

tambang batu bara dengan kedalaman  $\pm$  30 meter dan 425 mdpl yang tidak sengaja terbentuk atau dikenal sebagai danau buatan. Uniknya, danau ini terlihat berwarna biru diduga karena kandungan logam di dalamnya dan air yang asam dengan pH 5. Dengan keunikan tersebut, diduga adanya bakteri yang dapat bertahan hidup pada lingkungan yang ekstrem ini dan dapat menghasilkan metabolit sekunder, seperti senyawa antibiotik dengan aktivitas biologis yang kuat.

Sampel air dari Danau Biru diambil pada enam titik pengambilan berbeda dengan jarak masing-masing titik yaitu lima meter yang dapat dilihat pada Lampiran 1 Gambar 15. Sampel diambil menggunakan botol plastik yang sudah disterilkan terlebih dahulu dengan cara dibilas menggunakan alkohol, setelah itu dikeringkan, lalu di sterilkan dengan sinar UV 265 nm agar bakteri yang tumbuh nantinya benar-benar berasal dari air yang diambil. Hal ini didukung oleh penelitian Zhang et al., (2018) yang juga mengambil air dari Danau Urban di China untuk mengisolasi komunitas bakteri yang terdapat di dalamnya. Zhang menggunakan botol plastik steril untuk mengambil sampel penelitiannya. Setelah itu, sampel dibawa ke laboratorium dan disimpan di dalam lemari es (11).

Penelitian ini diawali dengan mengisolasi bakteri yang terdapat pada air Danau Biru. Metode yang digunakan adalah metode isolasi secara *pour plate*, karena sampel yang digunakan adalah sampel cair dan diharapkan bakteri tumbuh dan terdistribusi merata pada media. Cara Isolasi ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Sander (2012) tentang teknik isolasi bakteri. Untuk metode isolasi menggunakan sampel cair, dilakukan menggunakan metode *pour plate* dengan jumlah sampel yang sedikit, yaitu 0,1 sampai 1 ml (23). Media NA dipilih untuk menumbuhkan bakteri karena media ini merupakan media pertumbuhan umum yang biasa digunakan untuk menumbuhkan bakteri. Semua proses itu dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF).

Konsep aseptis ini didasari pada udara yang sudah melalui filter lalu berhembus dari dalam menuju keluar LAF, sehingga mencegah udara dari luar untuk masuk ke dalam. Selain itu, adanya api bunsen yang menyala di dalam LAF memperkuat kondisi aseptis pengerjaan.

Tahap selanjutnya adalah pemurnian bakteri hasil isolasi. Pada tahap pemurnian ini diharapkan didapatkannya isolat-isolat murni. Dari isolasi bakteri, dipilih koloni-koloni berbeda untuk selanjutnya dilakukan pemurnian. Pemurnian ini dilakukan untuk mendapatkan bakteri spesies tunggal dengan menggoreskan koloni secara zig-zag pada medium NA. Metode ini disebut *streak plate* karena dilakukan dengan cara menggoreskan koloni bakteri secara gradien yang sebelumnya diambil dengan jarum ose pada permukaan medium NA. Cara ini didukung dengan pendapat Sander (2012) yang juga menggunakan metode *streak plate* untuk pemurnian bakteri. Setelah menggoreskan bakteri pada satu sisi agar, jarum ose yang digunakan disterilkan ulang dengan cara *flambier* menggunakan api bunsen, lalu ujung terakhir goresan pertama ditarik untuk digoreskan pada sisi lainnya dan begitu seterusnya (23). Hal ini bertujuan agar bakteri semakin sedikit di setiap goresan, sehingga didapatkan koloni-koloni tunggal pada sisi akhir goresan dan memudahkan dalam pengamatan.

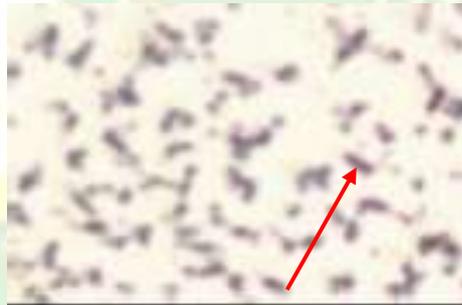
Hasil isolasi dan pemurnian bakteri dari air Danau Biru didapatkan delapan isolat berbeda berdasarkan pengamatan makroskopis (bentuk, warna, pinggir, permukaan dan elevasi koloni). Perbedaan inilah yang mendasari dilakukan pemurnian untuk setiap isolat. Setelah didapatkan koloni-koloni tunggal hasil pemurnian yang disebut isolat, selanjutnya dilakukan produksi antibiotik secara fermentasi dari isolat-isolat tersebut menggunakan bakteri uji yang telah dipilih.

Tabel 3. Hasil pengamatan makroskopis isolat bakteri dari air Danau Biru.

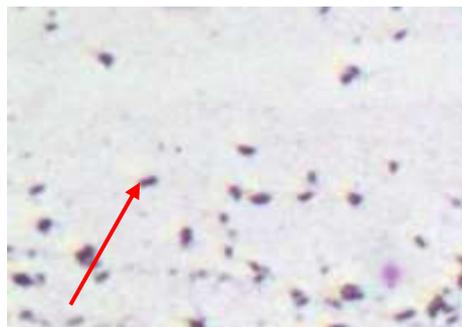
<u>Kode Isolat</u>	<u>Bentuk</u>	<u>Warna</u>	<u>Pinggir</u>	<u>Permukaan</u>	<u>Elevasi</u>
<u>ADB 1</u>	Circular	<u>Putih kekuningan</u>	Entire	<u>Licin</u>	<u>Convex</u>
<u>ADB 1.1</u>	Circular	<u>Putih kekuningan</u>	Lobate	<u>Licin</u>	<u>Convex</u>
<u>ADB 2</u>	Circular	<u>Putih</u>	Lobate	<u>Licin</u>	<u>Convex</u>

<a href="#">ADB 2.1</a>	Circular	<a href="#">Putih kekuningan</a>	Entire	<a href="#">Kasar</a>	Umbonate
<a href="#">ADB 2.2</a>	Circular	<a href="#">Putih</a>	Lobate	<a href="#">Licin</a>	<a href="#">Convex</a>
<a href="#">ADB 3</a>	Circular	<a href="#">Putih kehijauan</a>	Lobate	<a href="#">Licin</a>	<a href="#">Convex</a>
<a href="#">ADB 4.1</a>	Circular	<a href="#">Putih</a>	Lobate	<a href="#">Licin</a>	<a href="#">Convex</a>
<a href="#">ADB 5.2</a>	Circular	<a href="#">Putih</a>	Lobate	<a href="#">Licin</a>	<a href="#">Convex</a>

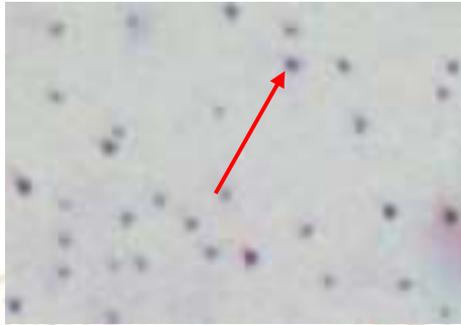
Sebelum digunakan, bakteri uji ini diidentifikasi dengan cara melihat bentuk sel di bawah mikroskop setelah dilakukan pewarnaan Gram, lalu ditumbuhkan pada medium selektif masing-masing bakteri tersebut. Ini merupakan uji konfirmasi terhadap bakteri yang digunakan untuk meyakinkan bahwa bakteri masih sesuai dan tidak terjadi kesalahan saat proses pemindahan maupun penyimpanan bakteri. Pengujian konfirmasi dilakukan terhadap empat bakteri uji yang digunakan, yaitu [S. aureus ATCC 25923](#), [S. mutans ATCC 25175](#), [P. aeruginosa ATCC 27853](#) dan [E. coli ATCC 25922](#).



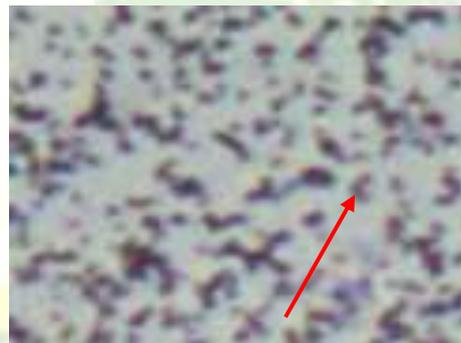
Gambar 4. Pengamatan mikroskopis bakteri *E. coli* dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Sel berbentuk basil.



Gambar 5. Pengamatan mikroskopis bakteri *P.aeruginosa* dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Sel berbentuk basil

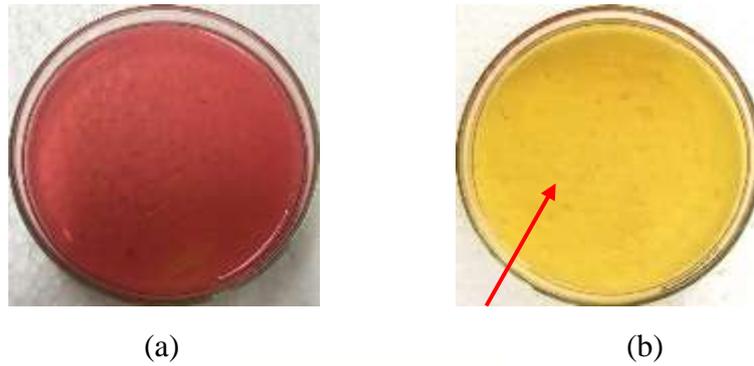


Gambar 6. Pengamatan mikroskopis bakteri *S. aureus* dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Sel berbentuk kokus



Gambar 7. Pengamatan mikroskopis bakteri *S. mutans* dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Sel berbentuk kokus

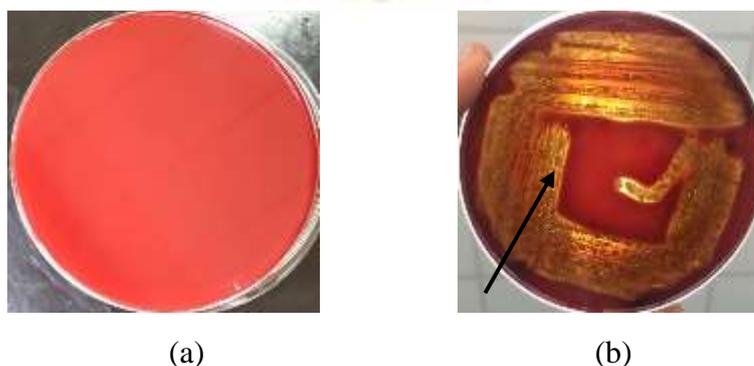
Media selektif adalah media khusus yang dapat dijadikan sebagai media untuk identifikasi spesies bakteri. Media ini hanya dapat menumbuhkan bakteri tertentu karena ke dalam media selektif ditambahkan zat kimia seperti antibiotik, sehingga dapat menekan pertumbuhan bakteri lainnya. Pengujian ini dilakukan terhadap empat bakteri uji yang digunakan.



Gambar 8. Pengujian konfirmasi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan media Mannitol Salt Agar (MSA)

Keterangan: (a) Tanpa bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923  
 (b) Dengan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Media selektif untuk bakteri *S. aureus* adalah MSA (Manitol Salt Agar). Media MSA memiliki sensitivitas tinggi untuk pertumbuhan *S. aureus* dan dapat digunakan sebagai media identifikasi bakteri *S. aureus* (54). Media ini hanya dapat ditumbuhkan oleh bakteri *S. aureus* saja. Pertumbuhan bakteri ini ditandai dengan perubahan warna media MSA dari merah menjadi kuning, ini menandakan bakteri yang digunakan benar *S. aureus*. MSA berisi mannitol, gula dan indikator pH phenol red. *S. aureus* akan memecah gula dan menghasilkan asam, sehingga suasana media menjadi asam. Suasana asam ini bereaksi dengan indikator phenol red yang menyebabkan media berubah menjadi kuning.



Gambar 9. Pengujian konfirmasi bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan media Tryptone Soya Agar (TSA)

Keterangan: (a) Tanpa bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175  
(b) Dengan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Selanjutnya dilakukan identifikasi bakteri *S. mutans* dengan media TSA (Tryptone Soya Agar). Menurut website resmi ATCC, bakteri *S. mutans* yang ditumbuhkan pada media TSA ditandai dengan terbentuknya zona bening pada bekas goresan bakteri. *S. mutans* mampu memecah sel darah yang terdapat pada media, sehingga menghasilkan daerah bening pada bekas goresan setelah diinkubasi selama 24 jam.

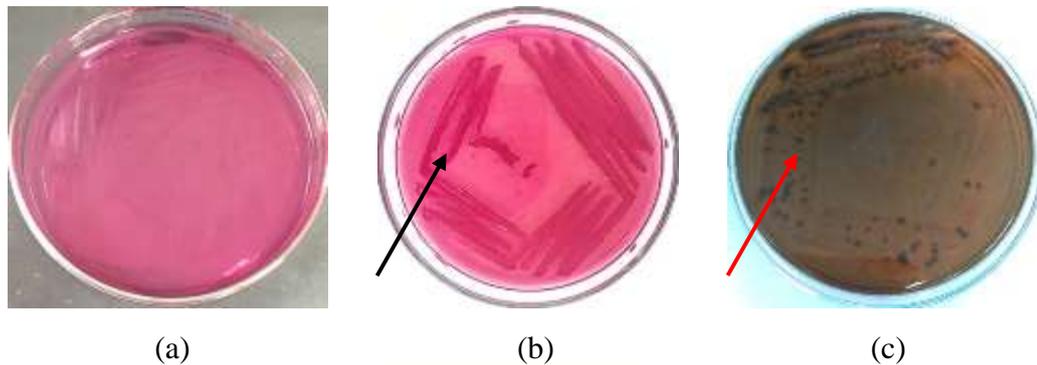


Gambar 10. Pengujian konfirmasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan media Cetrimide Agar

Keterangan : (a) Tanpa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853  
(b) Dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Pada pengujian bakteri *P. aeruginosa* dengan medium Cetrimide Agar, terlihat pertumbuhan bakteri berwarna kuning yang menunjukkan bahwa bakteri yang di uji benar *P. aeruginosa*. Media ini adalah media spesifik untuk pertumbuhan *P. aeruginosa* dan tidak bisa ditumbuhi oleh bakteri lain. Sesuai spesifikasi yang dikeluarkan oleh Merck, pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* ditandai dengan koloni yang tumbuh berwarna kuning (55).

Identifikasi ini juga dilakukan pada bakteri *E.coli*. Media selektif yang digunakan untuk bakteri ini adalah Endo agar dan Eosin Methylen Blue Agar (EMBA).



Gambar 11. Pengujian Konfirmasi Bakteri Uji *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan Media Endo Agar dan EMBA

Keterangan : (a) Media Endo Agar tanpa bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922  
 (b) Media Endo Agar dengan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922  
 (c) Media EMBA dengan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Dari hasil pengujian, terlihat bakteri tumbuh berwarna merah muda pada medium Endo Agar dan berwarna hijau pada medium EMBA yang menunjukkan bahwa bakteri yang di uji benar *E. coli*. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antibiotik isolat menggunakan bakteri uji yang sudah di konfirmasi.

Pengujian aktivitas antibiotik dilakukan dengan metode difusi agar, karena metode ini cukup sederhana dari segi pengerjaan dan pengukuran hasil yang didapatkan. Hasil diukur dalam bentuk diameter (mm) daerah bening yang terbentuk disekitar cakram. Diameter daerah bening tersebut merupakan hambatan pertumbuhan bakteri uji oleh isolat bakteri. Sebagai kontrol positif digunakan antibiotik amoxicillin karena antibiotik ini merupakan antibiotik spektrum luas yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Selain itu, bakteri uji yang digunakan merupakan bakteri dari golongan Gram positif dan Gram negatif dan isolat bakteri hasil isolasi juga belum teridentifikasi dari golongan Gram positif atau Gram negatif. Kontrol negatif yang digunakan adalah akuades steril, merupakan pelarut yang digunakan untuk membuat medium. Kontrol negatif ini berguna untuk meyakinkan bahwa diameter hambatan yang dihasilkan tidak berasal dari pelarut yang digunakan, sehingga diameter hambatan tersebut memang benar-benar berasal dari bakteri yang diujikan.

Sebelumnya, dibuat suspensi bakteri dari isolat-isolat yang sudah didapatkan tadi menggunakan larutan NaCl 0,85% steril sebanyak 10 ml. Alasan

digunakan larutan NaCl dengan konsentrasi 0.85% karena cairan sel bakteri isotonis dengan larutan NaCl 0.85% (56). Untuk menjaga kestabilan bakteri maka digunakan larutan NaCl 0.85% ini. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Agustien et al., (2018) yang juga menggunakan larutan NaCl 0.85% untuk menumbuhkan bakteri yang diisolasi dari tumbuhan Mangrove asal Pulau Kapo-Kapo dan Pulau Setan, Sumatera Barat (57). Selain itu, Jannah et al., (2018) juga mengisolasi bakteri endofitik dari *Citrus aurantifolia* dan juga menggunakan larutan NaCl 0.85% untuk menumbuhkan bakteri endofitik yang diperolehnya (58).

Suspensi bakteri dibuat dan dibandingkan kekeruhannya secara visual dengan larutan Mc Farland 0.5%. Cara ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Zapata dan Ramirez (2015) yang menggunakan Mc Farland 0.5% untuk membandingkan kekeruhan suspensi bakteri uji yang mereka gunakan sampai ke tingkat kekeruhan yang sama (59). Mc Farland ini sendiri adalah larutan terbuat dari barium klorida dan asam sulfat yang menghasilkan endapan barium sulfat. Mc Farland digunakan untuk standarisasi perkiraan jumlah bakteri dalam cairan suspensi dengan membandingkan kekeruhan suspensi yang akan diteliti dengan Mc Farland. Mc Farland 0.5% setara dengan  $1.5 \times 10^8$  bakteri dalam satu ml suspensi (60).

Setelah kekeruhan suspensi bakteri yang akan diuji sama dengan kekeruhan Mc Farland 0.5%, suspensi tersebut dimasukkan ke dalam medium produksi antibiotik. Medium produksi yang digunakan adalah medium NB sebanyak 90 ml. Suspensi bakteri yang akan diuji dimasukkan ke dalam medium NB, selanjutnya di inkubasi menggunakan rotary shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 24-48 jam pada suhu kamar. Medium NB dipilih karena medium ini merupakan medium pertumbuhan bakteri yang umum digunakan dan mengandung nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri. Agustien et al., (2017) juga menggunakan cara ini untuk produksi antibiotik bakteri endofitik dari tumbuhan *Piper betle* dan proses fermentasi antibiotik menggunakan rotary shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 24-48 jam pada suhu kamar (61).

Rotary shaker dilakukan dengan tujuan untuk mempercepat fase eksponensial bakteri sehingga fase stasioner lebih cepat dicapai dan antibiotik dapat

terbentuk dengan cepat, dimana antibiotik merupakan salah satu metabolit sekunder yang dihasilkan bakteri pada fase stasioner tersebut. Untuk pengujian aktivitas antibiotik yang dihasilkan oleh bakteri ini, dilakukan pencuplikan pada waktu ke 24, 36 dan 48 jam. Pencuplikan pada tiga waktu ini juga dilakukan oleh Putri (2017) yang ingin melihat aktivitas antibiotik bakteri endofitik yang diisolasinya dari tanaman enceng gondok *Eichhornia crassipes* (Mart.) di Danau Maninjau Sumatera Barat. Pencuplikan ini dilakukan untuk melihat waktu optimum yang dibutuhkan oleh bakteri dalam menghasilkan antibiotik (62). Selanjutnya, cuplikan tersebut di sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit, sama seperti yang dilakukan oleh Djamaan *et al.*, (2014) pada saat melihat aktivitas antimikroba bakteri dari batang, daun dan kulit buah manggis jenis *Garcinia mangostana* L. Sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan sel bakteri dengan cairan supernatan yang berisi senyawa antibiotik (7).

Cairan supernatan dari isolat bakteri ini selanjutnya diuji aktivitas antibiotiknya. Cairan supernatan dipilih karena senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri sudah dikeluarkan dari sel bakteri tersebut. Untuk skrining adanya aktivitas antibiotik biasanya digunakan cairan supernatan. Selain itu, pengujian dengan menggunakan cairan supernatan lebih mudah dan sederhana karena bisa langsung digunakan. Cara ini juga dilakukan oleh Rivai *et al.*, (2016) pada pengujian aktivitas antibiotik bakteri endofitik dari batang, daun dan pericarp tanaman manggis (*Garcinia mangostana* L.). Rivai *et al.*, menggunakan cairan supernatan hasil produksi antibiotik isolat yang di dapatkannya untuk selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antibiotik (63).

Tabel 4. Hasil diameter hambatan pada uji aktivitas antibiotik isolat bakteri dari air Danau Biru

<u>Kode Isolat</u>	<u>Lama Inkubasi (jam)</u>	<u>Diameter Hambatan terhadap Bakteri Uji (mm)</u>			
		<u><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</u>	<u><i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</u>	<u><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</u>	<u><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</u>
	24	7,10	7,15	9,15	8,00

<u>ADB</u>	<u>36</u>	<u>7,10</u>	<u>8,70</u>	<u>9,05</u>	<u>8,30</u>
<u>1</u>	<u>48</u>	<u>9,35</u>	<u>11,00</u>	<u>8,05</u>	<u>11,05</u>
<u>ADB</u>	<u>24</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>=</u>
<u>1.1</u>	<u>36</u>	<u>=</u>	<u>7,20</u>	<u>8,15</u>	<u>7,55</u>
	<u>48</u>	<u>11,45</u>	<u>8,20</u>	<u>9,00</u>	<u>8,35</u>
<u>ADB</u>	<u>24</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>=</u>
<u>2</u>	<u>36</u>	<u>7,00</u>	<u>7,30</u>	<u>=</u>	<u>7,25</u>
	<u>48</u>	<u>7,25</u>	<u>10,05</u>	<u>=</u>	<u>8,55</u>
<u>ADB</u>	<u>24</u>	<u>7,65</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>=</u>
<u>2.1</u>	<u>36</u>	<u>8,10</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>8,10</u>
	<u>48</u>	<u>9,20</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>8,10</u>
<u>ADB</u>	<u>24</u>	<u>30,55</u>	<u>10,40</u>	<u>7,75</u>	<u>8,75</u>
<u>2.2</u>	<u>36</u>	<u>31,05</u>	<u>10,55</u>	<u>8,10</u>	<u>9,20</u>
	<u>48</u>	<u>32,40</u>	<u>11,65</u>	<u>8,15</u>	<u>9,20</u>
<u>ADB</u>	<u>24</u>	<u>13,15</u>	<u>25,65</u>	<u>20,00</u>	<u>11,85</u>
<u>3</u>	<u>36</u>	<u>20,80</u>	<u>28,00</u>	<u>21,05</u>	<u>15,00</u>
	<u>48</u>	<u>19,40</u>	<u>30,30</u>	<u>23,05</u>	<u>15,15</u>
<u>ADB</u>	<u>24</u>	<u>=</u>	<u>8,00</u>	<u>7,30</u>	<u>7,50</u>
<u>4.1</u>	<u>36</u>	<u>=</u>	<u>9,40</u>	<u>7,55</u>	<u>7,85</u>
	<u>48</u>	<u>7,65</u>	<u>9,45</u>	<u>7,30</u>	<u>8,15</u>
<u>ADB</u>	<u>24</u>	<u>9,05</u>	<u>7,20</u>	<u>7,00</u>	<u>=</u>
<u>5.1</u>	<u>36</u>	<u>10,95</u>	<u>7,45</u>	<u>10,90</u>	<u>=</u>
	<u>48</u>	<u>10,05</u>	<u>8,15</u>	<u>10,05</u>	<u>=</u>

Keterangan: - = Tidak ada diameter hambat

Bakteri uji yang digunakan untuk melihat aktivitas antibiotik isolat adalah *S. aureus* ATCC 25923, *S. mutans* ATCC 25175, *P. aeruginosa* ATCC 27853 dan *E. coli* ATCC 25922. Bakteri ini dipilih karena sering menyebabkan infeksi pada manusia, mewakili bakteri dari golongan Gram positif dan Gram negative dan menarik bagi peneliti untuk diujikan pada isolat bakteri. Bakteri uji *S. aureus* ATCC 25923 dan *S. mutans* ATCC 25175 digunakan untuk melihat aktivitas antibiotik terhadap bakteri Gram positif. Sedangkan bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 dan *E. coli* ATCC 25922 digunakan untuk melihat aktivitas antibiotik terhadap bakteri Gram negatif.

Hasil uji aktivitas antibiotik bakteri dari air Danau Biru ini menunjukkan bahwa delapan isolat bakteri tersebut memiliki aktivitas antibiotik terhadap bakteri

uji yang digunakan, minimal terhadap dua bakteri uji. Aktivitas antibiotik ini ditandai dengan terbentuknya daerah bening disekitar cakram yang berisi supernatan hasil produksi antibiotik. Hasil ini sesuai dengan pendapat Ardiyansah (2009) yang menyatakan bahwa terbentuknya diameter hambat di sekeliling cakram yang berisi bakteri menandakan adanya kemampuan isolat bakteri dalam memproduksi metabolit sekunder atau senyawa ekstraseluler yang bersifat antibiotik yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri lain (64). Pada pengujian aktivitas antibiotik terhadap bakteri uji *S. aureus* ATCC 25923 selama 48 jam, diperoleh semua isolat memiliki aktivitas antibiotik. Aktivitas sangat kuat dengan diameter hambat >20 mm ditunjukkan oleh isolat dengan kode ADB 2.2 dan ADB 3 yang menghasilkan diameter hambat 30,55 mm dan 32,40 mm. Diameter hambat ini tergolong sangat besar jika dibandingkan dengan diameter hambat kontrol positif. Hal ini berarti bahwa aktivitas antibiotik yang dihasilkan isolat bakteri lebih bagus daripada antibiotik amoxicillin. Selain itu, untuk aktivitas antibiotik kuat dengan rentang diameter hambat 10-20 mm dihasilkan oleh isolat ADB 1.1 dan ADB 5.1. Sedangkan ADB 1, ADB 2, ADB 2.1 dan ADB 4.1 memiliki aktivitas antibiotik sedang dengan diameter hambat 5-10 mm.

Pada pengujian aktivitas antibiotik terhadap bakteri uji *S. mutans* ATCC 25175 selama 48 jam, diperoleh tujuh isolat bakteri yang menunjukkan adanya aktivitas antibiotik terhadap bakteri uji, kecuali isolat ADB 2.1. Untuk aktivitas yang sangat kuat dengan diameter hambat >20 mm dihasilkan oleh isolat ADB 3 dengan diameter 25,65 mm sampai 30,30 mm. Ini artinya isolat ADB 3 punya aktivitas yang bagus dalam mengobati infeksi bakteri oleh *S. mutans* yang menyebabkan karies gigi. Untuk aktivitas kuat ditunjukkan oleh isolat ADB 2.2, ADB 2 dan ADB 1 yang memberikan diameter hambat 10-20 mm. Sedangkan ADB 1.1, ADB 4.1 dan ADB 5.2 memiliki aktivitas antibiotik sedang dengan diameter hambat berkisar 5-10 mm.

Pada pengujian aktivitas antibiotik terhadap bakteri uji *P. aeruginosa* ATCC 27853 selama 48 jam, diperoleh enam isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibiotik. Aktivitas sangat kuat masih diberikan oleh isolat ADB 3 dengan diameter hambat 20,00 mm sampai 23,05 mm. Diameter ini masih tergolong sangat

besar walaupun tidak sebesar pada bakteri *S. aureus ATCC 25923* dan *S. mutans ATCC 25175*. Isolat ADB 5.1 menunjukkan diameter 7,00 mm sampai 10,90 mm yang termasuk ke dalam kategori kuat. Untuk aktivitas sedang ditunjukkan oleh isolat ADB 1, ADB 1.1, ADB 2.2 dan ADB 4.1 yang memiliki diameter hambat berkisar 5-10 mm. Sedangkan isolat ADB 2 dan ADB 2.1 tidak menunjukkan adanya daerah hambat di sekitar cakram.

Pada pengujian aktivitas antibiotik terhadap bakteri uji *E. coli ATCC 25922* selama 48 jam, diperoleh tujuh isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibiotik. Adapun pengelompokkan isolat-isolat bakteri tersebut, yaitu tidak ada yang bersifat sangat kuat dengan diameter hambat >20 mm. Dua isolat yang bersifat kuat ditunjukkan oleh isolat ADB 1 dan ADB 3 yang memiliki diameter hambat antara 10-20 mm. Selain itu, lima bakteri yang bersifat sedang dengan diameter hambat 5-10 mm dihasilkan oleh isolat ADB 1.1, ADB 2, ADB 2.1, ADB 2.2 dan ADB 4.1. Sedangkan satu isolat yang bersifat lemah yaitu ADB 5.2 tidak menghasilkan diameter hambat yang berarti bahwa bakteri ini tidak dapat mengobati infeksi bakteri oleh *E. coli* yang menyebabkan gangguan saluran pencernaan.

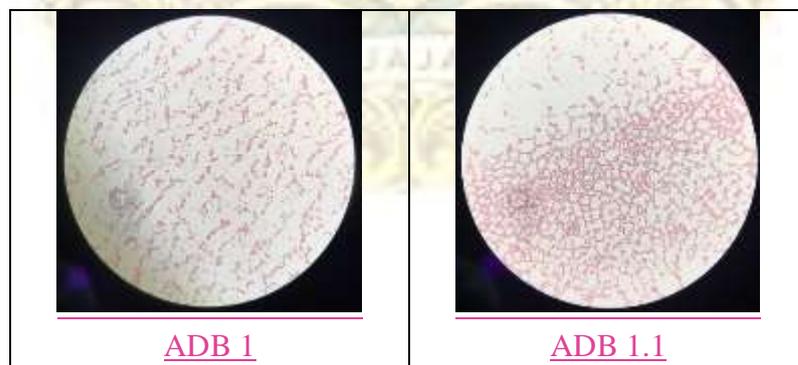
\_\_\_\_\_ Dari hasil pengujian aktivitas antibiotik, hasil yang berbeda pada setiap isolat dalam kemampuannya membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri lain wajar terjadi karena beda spesies maka berbeda pula kemampuan yang dihasilkannya. Selain itu, isolat bakteri juga belum diketahui spesiesnya. Voytsekhovskaya *et al.*, (2018), melakukan isolasi dan juga menguji aktivitas antimikroba bakteri yang diisolasi dari permukaan air danau bawah tanah yang terdapat pada gua Badzheyskaya and Okhotnichya di Siberia. Voytsekhovskaya *et al.*, melaporkan bahwa sepuluh isolat yang diperolehnya memiliki aktivitas antimikroba terhadap lima bakteri uji yang digunakan. Tiga isolat diantaranya memiliki aktivitas sangat kuat terhadap mikroba uji yang digunakan dengan diameter hambat yang diberikan >20 mm (65).

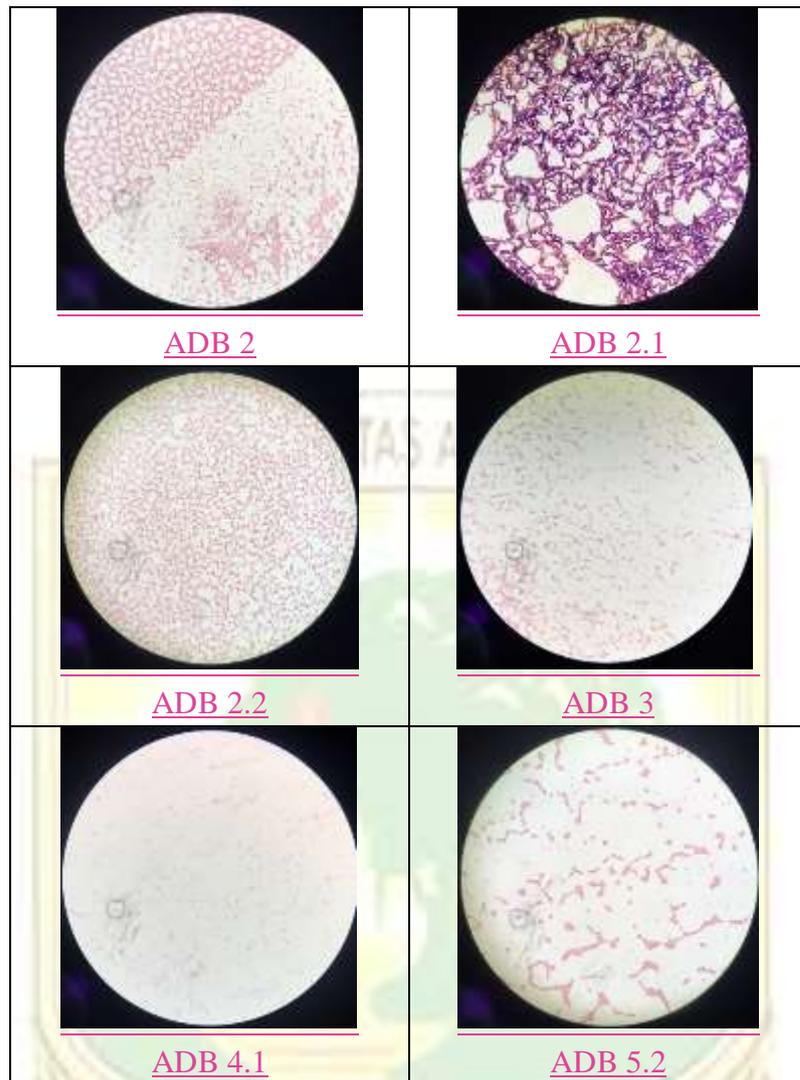
Diameter hambat terbesar secara umum ditunjukkan pada waktu fermentasi 48 jam. Hal ini didukung oleh hasil penelitian yang dilakukan oleh Djamaan *et al.*, (2012) yang menyatakan bahwa aktivitas antibiotik yang paling besar adalah pada lama fermentasi 48 jam. Lama fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas antibiotik

karena semakin lama waktu fermentasi, bakteri semakin aktif dan semakin banyak jumlahnya, sehingga kemampuan untuk memecah substrat dan membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri lain semakin besar (46).

Setelah pengujian aktivitas antibiotik, dilakukan karakterisasi isolat bakteri penghasil antibiotik dengan cara pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan secara makroskopis dilakukan dengan melihat morfologi koloni secara visual, antara lain bentuk, warna, pinggir, permukaan dan elevasi koloni. Untuk bentuk koloni, semua koloni berbentuk *circular* (bulat). Warna koloni yang didapatkan yaitu berwarna putih untuk isolat ADB 2, ADB 2.2, ADB 4.1 dan ADB 5.2 dan putih kekuningan untuk isolat lainnya. Pinggir koloni yang teramati hanya dua jenis, *entire* (rata) untuk isolat ADB 1 dan ADB 2.1 dan *lobate* (berlekuk) untuk isolat lainnya. Selain itu, tekstur permukaan bakteri ada yang halus dan ada yang kasar. Untuk elevasi koloni semua isolat adalah *convex* (cembung) kecuali isolat ADB 2.1 yang berbentuk *umbonate* (seperti kawah). Hasil ini dapat dilihat pada Tabel 5.

Suriawiria (2005) menyatakan bahwa perbedaan koloni dari mikroba merupakan ciri khas bagi suatu spesies. Bentuk koloni, warna koloni, mengkilat tidaknya, halus dan kasarnya permukaan merupakan sifat-sifat yang diperlukan untuk identifikasi suatu spesies. Kebanyakan bakteri memiliki warna putih, kelabu, kekuning-kuningan, hingga bening. Tetapi, pada beberapa spesies mempunyai pigmen yang berwarna (66).





Gambar 12. Pewarnaan Gram dan pengamatan isolat bakteri di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali.

Keterangan : Bakteri Gram positif (+) : warna ungu  
 Bakteri Gram negatif (-) : warna merah

\_\_\_\_\_ Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram dan mengamati bentuk sel bakteri dengan bantuan mikroskop. Pada pengamatan ini, isolat bakteri diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Perbedaan golongan bakteri Gram positif dan Gram negatif didasari pada perbedaan struktur dinding sel bakteri. Sebagian besar dinding sel bakteri Gram positif terdiri dari

peptidoglikan, sedangkan dinding sel bakteri Gram negatif mempunyai kandungan lipid yang tinggi dibandingkan bakteri Gram positif.

Perbedaan golongan bakteri dapat dilihat dari hasil pewarnaan Gram yang dilakukan, dimana bakteri Gram positif akan terlihat berwarna ungu dan bakteri Gram negatif akan terlihat berwarna merah. Terdapat dua hal yang terjadi pada proses pewarnaan ini, yaitu zat warna tambahan (safranin) tidak dapat berikatan dengan dinding sel karena zat warna asli (kristal violet) yang masih berikatan, sehingga yang nampak ialah zat warna asli (ungu), dalam hal ini disebut bakteri Gram positif. Kedua, zat warna tambahan (merah) berikatan dengan dinding sel setelah zat warna asli (ungu) larut saat dicuci dengan alkohol. Dalam hal ini, bakteri dikatakan Gram negatif. Dari hasil yang diperoleh Gambar 12, terlihat bahwa satu isolat bakteri yang berpotensi sebagai penghasil antibiotik merupakan bakteri Gram positif dengan bentuk sel basil yang dihasilkan oleh isolat ADB 2.1. Tujuh isolat bakteri lain merupakan bakteri Gram negatif dengan bentuk basil.

Semua isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibiotik selanjutnya diidentifikasi secara biokimia di Laboratorium Balai Penyidik dan Pengujian Veteriner Regional II Bukittinggi, Provinsi Sumatera Barat. Sifat biokimia merupakan kriteria yang amat penting didalam identifikasi spesimen bakteri yang tak dikenal karena secara morfologis biakan atau pun sel bakteri yang berbeda dapat tampak serupa.

Tabel 5. Hasil identifikasi secara biokimia isolat bakteri dari air Danau Biru yang berpotensi sebagai penghasil antibiotik.

<u>No</u>	<u>Perlakuan</u>	<u>Koloni yang di proses</u>							
		<u>ADB 1</u>	<u>ADB 1.1</u>	<u>ADB 2</u>	<u>ADB 2.1</u>	<u>ADB 2.2</u>	<u>ADB 3</u>	<u>ADB 4.1</u>	<u>ADB 5.2</u>
1	<u>Aerob/ Anaerob</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>

2	<u>TSIA</u>	<u>M/K</u>	<u>M/K</u>	<u>M/K</u>	<u>K/M</u>	<u>M/K</u>	<u>M/M</u>	<u>M/K</u>	<u>M/K</u>
3	<u>Gas</u>	±	±	±	-	±	-	±	±
4	<u>H<sub>2</sub>S</u>	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<u>Catalase</u>	±	±	±	±	±	±	±	±
6	<u>Oxidase</u>	-	-	±	-	±	±	±	±
7	<u>Motilitas</u>	±	±	±	±	±	±	±	±
8	<u>Indol</u>	-	-	-	-	-	-	-	-
9	<u>Urea</u>	±	±	±	±	±	±	±	±
10	<u>Citrate</u>	±	±	±	-	±	±	±	±
11	<u>Laktosa</u>	-	-	-	±	-	-	-	-
12	<u>Glukosa</u>	±	±	±	±	±	±	±	±
13	<u>Sukrosa</u>	±	±	±	±	±	-	±	±
14	<u>Mannitol</u>	±	±	±	±	±	-	±	±
15	<u>MR</u>	-	-	±	-	±	-	±	±
16	<u>VP</u>	±	±	±	±	±	-	±	±
17	<u>OF</u>	±	±	±	±	±	±	±	±
18	<u>KCN</u>	±	±	±		±	±	±	±
19	<u>Arginine</u>	-	-	-		-	-	-	-
20	<u>Lysin</u>	±	±	-		-	-	-	-
21	<u>Ornithin</u>	-	-	-		-	-	-	-
22	<u>Phenylalanin</u>	±	±	-		-	±	-	-
23	<u>Aesculin</u>	±	±	-		-	-	-	-
24	<u>Arabinose</u>				±				
25	<u>Xylose</u>	±	±	±	-	±	-	±	±
26	<u>Nitrat</u>	-	-	-	-	-	-	-	-
27	<u>Gelatin</u>	±	±	-	±	-	±	-	-
<b><u>Hasil Identifikasi</u></b>		<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

Keterangan:   +: hasil positif                   A: Aerob  
                   -: hasil negatif                   M: Merah  
   K: Kuning

1. *Enterobacter sp.*  
 2. *Aeromonas sp.*  
 3. *Bacillus sp.*  
 4. *Pseudomonas sp.*

Karakteristik dan klasifikasi sebagian mikroba seperti bakteri berdasarkan pada reaksi enzimatik ataupun biokimia. Mikroba dapat tumbuh pada beberapa tipe media yang dideteksi dengan interaksi mikroba dengan medium atau reagen test yang akan menghasilkan perubahan warna. Untuk bakteri gram positif terdapat 18 parameter yang diamati, yaitu *Triple Sugar Iron Test (TSIA)*, gas, H<sub>2</sub>S, katalase, oksidase, motilitas, indol, urea, sitrat, laktosa, glukosa, sukrosa, manitol, *Methyl*

*Red* (MR), *Voges Proskauer* (VP), Oksidasi-Fermentasi (OF), nitrat, gelatin. Pada bakteri gram negatif ditambahkan 10 parameter uji, yaitu KCN, arginine, lysin, ornithin, fenilalanin, aesculin, arabinose, raffinose, sorbitol dan trehalase.

Pertama dilakukan uji TSIA, dimana TSIA ini merupakan media untuk melihat kemampuan suatu mikroorganisme dalam memfermentasikan gula. TSIA digunakan untuk membedakan beberapa jenis bakteri yang bersifat Gram negatif dan memfermentasikan glukosa kemudian membentuk asam, sehingga dapat dibedakan dengan bakteri Gram negatif lain. Perbedaan ini didasarkan pada pola fermentasi karbohidrat dan produksi H<sub>2</sub>S pada tabung reaksi. Media ini memiliki kandungan tiga gula di dalamnya, yaitu sukrosa, laktosa dan glukosa. Komponen ini akan berpengaruh terhadap penggunaan karbohidrat dan keadaan asam yang terbentuk. Indikator pH, yaitu phenol red, ditambahkan untuk menunjukkan adanya perubahan pH akibat fermentasi gula. Media uji ini dibuat berupa agar miring, dimana untuk pengujian bakteri uji diambil menggunakan jarum ose lurus kemudian ditusukan ke dasar tabung reaksi dan digores pada permukaan agar miring.

Hasil positif asam ditandai dengan perubahan warna media menjadi kuning pada bagian lereng dan dasar media. Hal tersebut bisa terjadi karena bakteri uji memiliki enzim betagalaktosidase dan sukrase yang dapat memecah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa serta memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Warna kuning pada bagian bawah media menunjukkan adanya penguraian glukosa, jika semua media berwarna kuning menunjukkan penguraian sukrosa. Warna kuning juga mengindikasikan suasana asam dan warna merah mengindikasikan suasana alkalin. Dari delapan isolat, terdapat enam isolat yang berwarna kuning pada bagian bawah media, satu isolat yang berwarna merah pada seluruh bagian media dan satu isolat yang berwarna kuning pada bagian atas media.

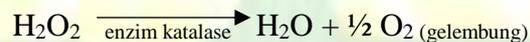
Adanya gas dapat dilihat dengan cara melihat rongga udara dalam media TSIA bahkan beberapa bakteri dapat memecah media. Isolat ADB 2.2 memperlihatkan media terangkat ke bagian atas tabung akibat adanya gas yang dihasilkan oleh isolat bakteri. Dari delapan isolat yang diuji, enam isolat menghasilkan gas kecuali isolat ADB 2.1 dan ADB 3. Isolat dengan kode ADB 2

menghasilkan gas yang amat banyak sehingga media rusak dan terangkat ke atas tabung.

Selanjutnya diamati apakah ada gas yang terbentuk, gas yang dimaksud disini adalah H<sub>2</sub>S. Bakteri yang menghasilkan H<sub>2</sub>S menyebabkan media menjadi hitam pada bagian permukaan agar. Media yang digunakan adalah media TSIA dengan kandungan tiosulfat. Untuk produksi H<sub>2</sub>S, tidak satupun isolat yang menghasilkan gas ini.



Untuk mengetahui apakah bakteri yang akan di uji merupakan bakteri aerob maupun anaerob dan mengetahui kemampuan mikroorganisme untuk menguraikan hidrogen peroksida dengan menghasilkan enzim katalase, dilakukan uji katalase. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebenarnya beracun bagi bakteri. Namun mereka dapat tetap hidup dengan menghasilkan enzim katalase yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Uji ini dikatakan positif apabila terdapat gelembung pada tetesan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang ditambahkan bakteri. Bakteri diletakkan di tetesan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada kaca objek menggunakan jarum ose. Dari delapan isolat bakteri yang diuji, diperoleh hasil yang positif pada semua isolat bakteri.

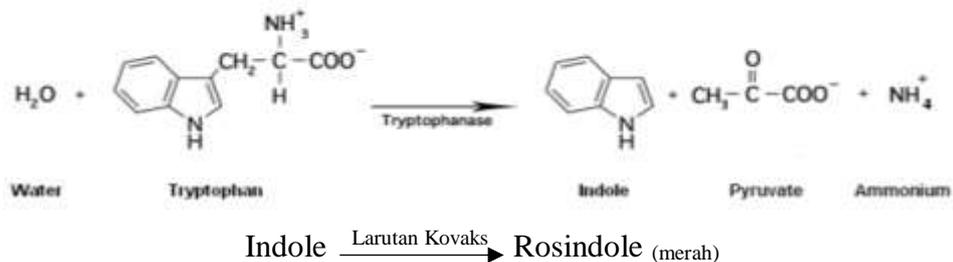


Untuk mengetahui bakteri jenis enterik atau non enterik, pengujian yang dilakukan adalah uji oksidase. Reagen yang digunakan terdiri dari p-aminodimetil oksalat dan alfa naftol. Apabila terjadi perubahan warna menjadi biru violet maka uji oksidase dinyatakan positif dan menandakan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri non enterik, sedangkan bila tidak terjadi perubahan warna maka uji oksidase dinyatakan negatif dan menandakan bakteri tersebut adalah bakteri enterik. Mekanisme perubahan warna medium dari kuning keruh menjadi biru dikarenakan enzim sitokrom oksidase yang berubah menjadi bentuk tidak aktif dengan mereduksi sitokrom c. Enzim ini akan menjadi bentuk aktifnya kembali jika terjadi transfer elektron ke molekul oksigen. Keberadaan oksigen pada enzim oksidase akan mereduksi senyawa organik diantaranya senyawa yang terdapat pada oxidase test strip yang mengandung p-aminodimetil oksalat dan α-naftol (67). Pada uji

oksidase ini didapatkan hasil negatif untuk tiga isolat dan hasil positif untuk empat isolat.

Uji motilitas bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri memiliki flagel. Setelah bakteri ditusukkan pada bagian tengah agar dengan jarum ose lurus, lalu dilakukan inkubasi selama 24 jam. Apabila bakteri membentuk serabut-serabut yang menyebar pada hampir seluruh bagian medium, maka bakteri tersebut motil atau uji dinyatakan positif. Akan tetapi, jika bakteri hanya tumbuh pada bekas tusukan jarum saja, maka bakteri tersebut tidak motil atau uji dinyatakan negatif. Hasil ini disebabkan karena bakteri yang memiliki flagel akan menyebar pada permukaan dan bagian agar lainnya. Delapan isolat bakteri menunjukkan hasil positif.

Untuk melihat kemampuan suatu organisme dalam mendegradasi asam amino triptofan dan menghasilkan indol, dilakukan uji indol (68). Tryptophan merupakan asam amino esensial yang dapat mengalami oksidasi dengan proses enzimatik bakteri. Konversi triptofan menjadi produk metabolik di mediasi oleh enzim tryptophanase. Hasil uji indol yang diperoleh negatif karena tidak terbentuk lapisan (cincin) berwarna merah muda pada permukaan biakan, artinya bakteri ini tidak dapat mendegradasi asam amino triptofan dan menghasilkan indol yang dapat diketahui dengan menambahkan larutan kovaks (69). Dari delapan isolat bakteri uji, semua isolat bakteri menunjukkan hasil negatif.

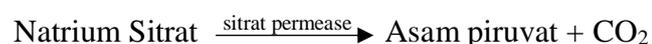


Uji urea dilakukan untuk mengetahui bakteri yang memiliki enzim urease. Urea akan di ubah menjadi amoniak, hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna media dari kuning menjadi merah. Media urea berisi indikator phenol red yang mempengaruhi perubahan warna akibat terbentuknya amoniak. Dari delapan isolat bakteri, semua isolat menunjukkan hasil positif.

Untuk melihat reaksi dekarboksilasi terhadap asam amino, dilakukan uji dekarboksilasi terhadap asam amino arginin, lysine dan ornithin. Uji ini dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri dalam dekarboksilasi asam amino dan menghasilkan pH alkalin, sehingga terlihat perubahan media yang semula berwarna ungu menjadi berwarna kuning. Hasil pengujian terlihat bahwa semua isolat bakteri tidak mampu mendekarboksilasi asam amino arginin dan ornithine yang ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna media menjadi kuning. Untuk isolat kode ADB 1 dan ADB 1.1 positif uji lysin yang terlihat pada perubahan warna media menjadi kuning.

Untuk melihat kemampuan bakteri dalam mendeaminasi asam amino, dilakukan pengujian phenilalanin. Pengujian ini menggunakan media yang mengandung phenilalanin dan  $\text{FeCl}_3$  sebagai indikator. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau dari media yang tidak berwarna. Hasil negatif ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna media yang berarti bahwa bakteri tidak mampu mendeaminasi phenilalanin. Dari delapan isolat yang diuji, tiga isolat positif dapat mendeaminasi asam amino, yaitu ADB 1, ADB 1.1 dan ADB 3.

Uji sitrat dilakukan untuk mengetahui bakteri yang memiliki enzim sitrat permease. Media yang dipakai adalah media *Simons citrate* yang berisi natrium sitrat sebagai sumber karbon,  $\text{NH}_4^+$  sebagai sumber nitrogen dan indikator BTB sebagai indikator pH. Tujuan uji ini adalah untuk mengetahui apakah bakteri menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Apabila bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon, maka asam piruvat yang terbentuk akan hilang karena kelebihan natrium sitrat akan bereaksi dengan  $\text{CO}_2$  dan  $\text{H}_2\text{O}$  untuk menghasilkan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  yang bersifat basa, sehingga suasana media akan berubah menjadi basa, ditandai dengan warna media yang berubah menjadi biru karena adanya indikator BTB dan uji dinyatakan positif. Apabila tidak terjadinya perubahan warna media dari hijau menjadi biru, artinya bakteri ini tidak mempunyai enzim sitrat permease, yaitu enzim spesifik yang membawa sitrat ke dalam sel (68). Dari delapan isolat uji, tujuh isolat menunjukkan hasil positif dan satu isolat, yaitu ADB 2.1 menunjukkan hasil negatif.





Uji laktosa, glukosa, sukrosa dan manitol bertujuan untuk mengetahui adanya enzim pengurai gula pada bakteri. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna media dari biru kehijauan menjadi warna kuning, yang menandakan bakteri memiliki enzim pengurai gula yang memecah gula menjadi asam. Terdapat satu isolat bakteri ADB 2.1 yang positif memiliki enzim pengurai laktosa. Semua isolat bakteri positif memiliki enzim pengurai glukosa dan hanya satu isolat bakteri yang negatif untuk pengujian sukrosa dan mannitol, yaitu isolat ADB 3.

Uji MR-VP dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri dapat mengubah glukosa menjadi piruvat. Media pada pengujian ini mengandung glukosa, pepton dan buffer fosfat. Organisme yang melakukan fermentasi asam campuran akan menghasilkan asam untuk mempengaruhi buffer fosfat, sehingga menyebabkan penurunan pH. Organisme yang melakukan jenis fermentasi lainnya tidak dapat mempengaruhi buffer fosfat. Pada uji MR hasil dinyatakan positif jika medium bening yang sudah ditumbuhi bakteri akan berubah menjadi merah bila ditambahkan *metil red* yang menandakan suasana asam. Uji VP dinyatakan positif jika medium bening yang sudah ditumbuhi bakteri akan berubah warna menjadi merah muda saat ditambahkan KOH dan alfa naftol. Warna ini berubah akibat pemecahan glukosa yang bereaksi dengan KOH dan alfa naftol. Terdapat empat isolat bakteri positif uji MR dan satu isolat bakteri negatif uji VP (68).

Uji Oksidasi-Fermentasi adalah dua proses metabolisme penting mikroorganisme. Medium *Hugh Leifson medium* yang ditusuk bakteri ditutup dengan paraffin untuk mencegah oksigen ikut bereaksi pada pengujian fermentasi dan dibiarkan terbuka untuk pengujian oksidasi. Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme untuk menggunakan karbohidrat dengan cara fermentasi atau oksidasi. Hasil positif ditunjukkan dari perubahan media warna hijau menjadi kuning. Dari hasil pengujian, semua isolat bakteri menunjukkan hasil yang positif.

Uji nitrat banyak menunjukkan hasil positif pada bakteri anaerob. Medium *nitrate broth* yang telah ditumbuhi bakteri ditambah dengan larutan *A dan larutan*

Basam sulfanilat dan  $\alpha$ -naftol, hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna dari bening menjadi merah. Hasil uji ini yaitu semua isolat bakteri tidak dapat menguraikan nitrat. Hal ini sesuai dengan uji katalase yang menyatakan bahwa semua isolat bakteri bersifat aerob, sedangkan uji nitrat ini akan positif untuk bakteri yang bersifat anaerob.

Uji gelatin dilakukan untuk mengetahui bakteri yang mampu menguraikan gelatin. Hasil positif ditunjukkan dari zona bening disekitar koloni bakteri. Hasil yang di dapatkan yaitu gelatin positif pada empat isolat bakteri yang menunjukkan zona bening di sekitar koloni bakteri karena gelatin yang sudah diuraikan dan empat isolat bakteri yang lain menunjukkan hasil yang negatif dengan tidak terbentuknya zona bening disekitar koloni.

Meskipun uji biokimia merupakan cara yang konvensional dalam identifikasi bakteri, namun sampai saat ini uji biokimia tetap dilakukan dalam penelitian-penelitian untuk mengetahui sifat-sifat mikroorganisme. Sawian *et al.*, (2018) menggunakan uji biokimia untuk mengidentifikasi isolat bakteri dari bir yang berasal dari beras lokal (Kiad). Sawian *et al.* menemukan lima isolat dari enam sampel yang diuji dan memiliki hasil pengujian biokimia yang beragam (70). Selain itu, Alfadil *et al.*, (2018) juga menggunakan uji biokimia dalam mengidentifikasi bakteri dari uang kertas di Sudan yang diambil dari berbagai tempat dan dibandingkan dengan kontrol yaitu uang kertas yang langsung diambil pada bank sentral (71).

Dari karakterisasi makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia yang telah dilakukan, didapatkan empat genus berbeda dari delapan isolat bakteri, diantaranya *Enterobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. Menurut Kus (2014), bakteri *Enterobacter* merupakan bakteri yang dapat ditemui di air (72) dan semua hasil uji biokimia yang dilaporkan Kus sama dengan hasil yang di dapatkan. *Aeromonas* sp. juga banyak ditemukan di lingkungan, khususnya air. Pal (2018) melaporkan bahwa *Aeromonas* sp. banyak ditemukan di tank air yang biasa digunakan untuk aktivitas sehari-hari, padahal bakteri ini merupakan bakteri patogen yang seharusnya dihindari (73). Selain itu, El-Gay Ar (2017) juga menemukan beberapa bakteri yang setelah dilakukan uji biokimia dan sekuensing

gen 16S rRNA teridentifikasi sebagai *Bacillus* sp. pada air ledeng dan pada empat sampel air kemasan (74). Handschuh (2017) juga melaporkan bahwa spesies *Pseudomonas* dapat ditemukan di tanah dan air, seperti air laut dan air danau (75).

\_\_\_\_\_ Isolat yang sangat potensial selanjutnya di ekstrak untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibiotik terbaik yang ditunjukkan oleh isolat ADB 2.2 dan ADB 3. Dilakukan ekstraksi secara maserasi dengan pelarut etil asetat dari bagian supernatan hasil produksi antibiotik. Didapatkan berat ekstrak kental isolat ADB 2.2 sebanyak 0,021 gram dan isolat ADB 3 sebanyak 0,046 gram.

Tahap terakhir adalah melihat profil kromatografi metabolit sekunder menggunakan KLT. Pengujian KLT bertujuan untuk melihat profil metabolit sekunder melalui noda dari bakteri yang berperan dalam menghasilkan aktivitas antibiotik. Pengujian KLT ini dilakukan untuk isolat yang memiliki aktivitas antibiotik terbaik saja, yaitu diameter lebih dari 30 mm yang dihasilkan oleh isolat dengan kode ADB 2.2 dan ADB 3. Fase gerak yang digunakan adalah heksan dan etil asetat dengan perbandingan 2.5 : 7.5. Eluen ini dipilih dengan alasan untuk melihat profil kromatografi metabolit sekunder bakteri yang bersifat semi polar sampai non polar. Fase gerak ini juga digunakan oleh Sharon *et al.*, (2013). Sharon *et al.*, menggunakan fase gerak heksan dan etil asetat dengan perbandingan 1 : 2 untuk melihat profil senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. dengan KLT dan mendapatkan empat noda (76). Selain itu, dilihat juga profil kromatografi metabolit sekunder isolat bakteri yang bersifat polar sampai semi polar menggunakan eluen toluen : etil asetat : asam format dengan perbandingan 7 : 2.5 : 0.5. Arifa (2018) juga menggunakan eluen ini untuk melihat profil kandungan kimia dari *Stereocaulon graminosum* dengan toluen : etil asetat : asam format 70 : 25 : 5 dengan KLT (77).

Sejauh ini, belum ditemukan fase gerak spesifik untuk pemisahan senyawa metabolit sekunder dari bakteri *Aeromonas* sp. dan *Pseudomonas* sp. kombinasi pelarut heksan dan etil asetat merupakan eluen yang umum dipakai bila sampel yang digunakan belum pernah dilaporkan sebelumnya. Telah dicoba berbagai fase gerak untuk memisahkan senyawa metabolit sekunder dari bakteri-bakteri ini

sampai ditemukan heksan : etil asetat (2.5 : 7.5) dan toluen : etil asetat : asam format (7 : 2.5 : 0.5) yang cocok dan dapat memisahkan senyawa-senyawa tersebut dengan jelas. Inilah alasan mengapa fase gerak ini dipilih untuk melihat profil senyawa metabolit yang dihasilkan oleh bakteri ini.

Plat KLT dianalisa dengan cara melihat noda di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Pada panjang gelombang UV 254 nm, plat KLT akan berpendar dan noda akan terlihat gelap. Sedangkan pada panjang gelombang UV 366 nm, noda akan berpendar dan plat KLT akan terlihat gelap. Noda yang terlihat pada sinar UV dapat dilihat pada Lampiran 3 Gambar 18 sampai Gambar 21. KLT yang sudah berisi noda setelah dilihat dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm diberi penampak noda *anisaldehid sulfuric acid* (ANS) dengan cara dicelupkan, setelah itu dilakukan pemanasan untuk melihat warna yang dihasilkan.



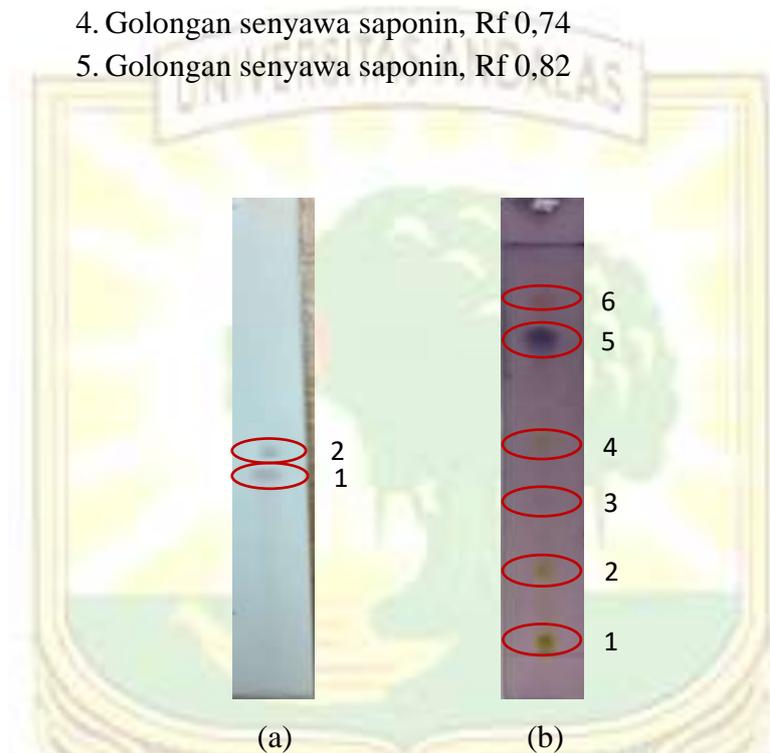
Gambar 13. Profil kromatografi metabolit sekunder ekstrak etil asetat isolat bakteri dari air Danau Biru dengan eluen toluen : etil asetat : asam format (7 : 2.5 : 0.5) dengan penampak noda ANS

Keterangan : (a) ADB 2.2 terdapat empat noda

1. Golongan senyawa saponin, Rf 0,50
2. Golongan senyawa terpenoid, Rf 0,54
3. Golongan senyawa saponin, Rf 0,76
4. Golongan senyawa saponin, Rf 0,84

(b) ADB 3 terdapat lima noda

1. Golongan senyawa saponin, Rf 0,50
2. Golongan senyawa terpenoid, Rf 0,56
3. Golongan senyawa dibenzofuran, Rf 0,64
4. Golongan senyawa saponin, Rf 0,74
5. Golongan senyawa saponin, Rf 0,82



Gambar 14. Profil kromatografi metabolit sekunder ekstrak etil asetat isolat bakteri dari air Danau Biru dengan eluen heksan : etil asetat (2.5 : 7.5) dengan penampak noda ANS

Keterangan : (a) ADB 2.2 terdapat dua noda

1. Golongan senyawa terpenoid, Rf 0,46
2. Golongan senyawa terpenoid, Rf 0,52

(b) ADB 3 terdapat enam noda

1. Golongan senyawa flavonoid, Rf 0,16
2. Golongan senyawa flavonoid, Rf 0,38
3. Golongan senyawa flavonoid, Rf 0,40
4. Golongan senyawa flavonoid, Rf 0,52
5. Golongan senyawa saponin, Rf 0,72
6. Golongan senyawa fenolik, Rf 0,80

Variasi warna yang diberikan oleh senyawa ketika dicelupkan dengan ANS tergantung dari gugus fungsi yang ada pada senyawa tersebut dan warna yang diberikan spesifik untuk senyawa tertentu. Prinsip penampak noda ini yaitu ANS akan bereaksi dengan gugus fungsi yang memiliki gugus karbonil pada senyawa, dimana ANS akan berikatan dengan senyawa. Warna orange yang terlihat pada plat KLT mengindikasikan kelompok fenolik. Warna kehijauan menunjukkan kelompok dibenzofuran. Warna kuning mengindikasikan kelompok senyawa flavonoid (78). Warna biru hingga ungu mengindikasikan bahwa senyawa tersebut termasuk golongan saponin. Warna merah mengindikasikan kelompok terpenoid. ANS ini dapat mendeteksi terpenoid maupun senyawa lain yang memiliki dua gugus aromatik yang tidak terdeteksi dengan sinar UV. ANS akan mengoksidasi senyawa pada lempeng KLT, sehingga struktur dari komponen kimianya akan dipecah yang mengakibatkan panjang gelombang senyawa bergeser ke sinar tampak (79).

Sifat antibiotik yang sangat besar tidak terlepas dari senyawa-senyawa yang berperan, seperti saponin dan terpenoid. Senyawa golongan saponin memiliki gugus aglikon (senyawa bukan gula) yang berperan sebagai antibakteri, selain itu terpenoid memiliki gugus hidroksil dan bersifat hidrofilik. Senyawa-senyawa ini akan merusak membran sel bakteri. Permeabilitas dinding sel bakteri akan berkurang dan bakteri akan kekurangan nutrisi, sehingga pertumbuhan bakteri akan terganggu atau mati (79). Arifa (2018) menggunakan penampak noda ANS ini pada saat melihat kemurnian senyawa hasil isolasi dari *Stereocaulon graminosum*. Selain itu, Nasr *et al.*, (2015) juga menggunakan penampak noda ANS ini untuk melihat profil metabolit sekunder dari *Streptomyces baarnensis*. Nasr *et al.*, mendapatkan sembilan noda metabolit sekunder dengan berbagai warna (80).

Dengan penampak noda ANS tersebut, didapatkan dua noda untuk ekstrak dari isolat ADB 2.2 dengan Rf 0,46 dan 0,52 dan enam noda dari ekstrak isolat ADB 3 dengan Rf 0,16, 0,38, 0,40, 0,52, 0,72 dan 0,80 menggunakan pelarut heksan : etil asetat (2.5 : 7.5). Selain itu, didapatkan empat noda berwarna merah untuk ekstrak dari isolat ADB 2.2 dengan Rf 0,50, 0,54, 0,76 dan 0,84 dan lima noda untuk ekstrak dari isolat ADB 3 dengan Rf 0,50, 0,56, 0,64, 0,74 dan 0,82

menggunakan pelarut toluen : etil asetat : asam format (7 : 2.5 : 0.5). Semua noda terpisah jelas dan dihitung nilai Rf masing-masing noda.

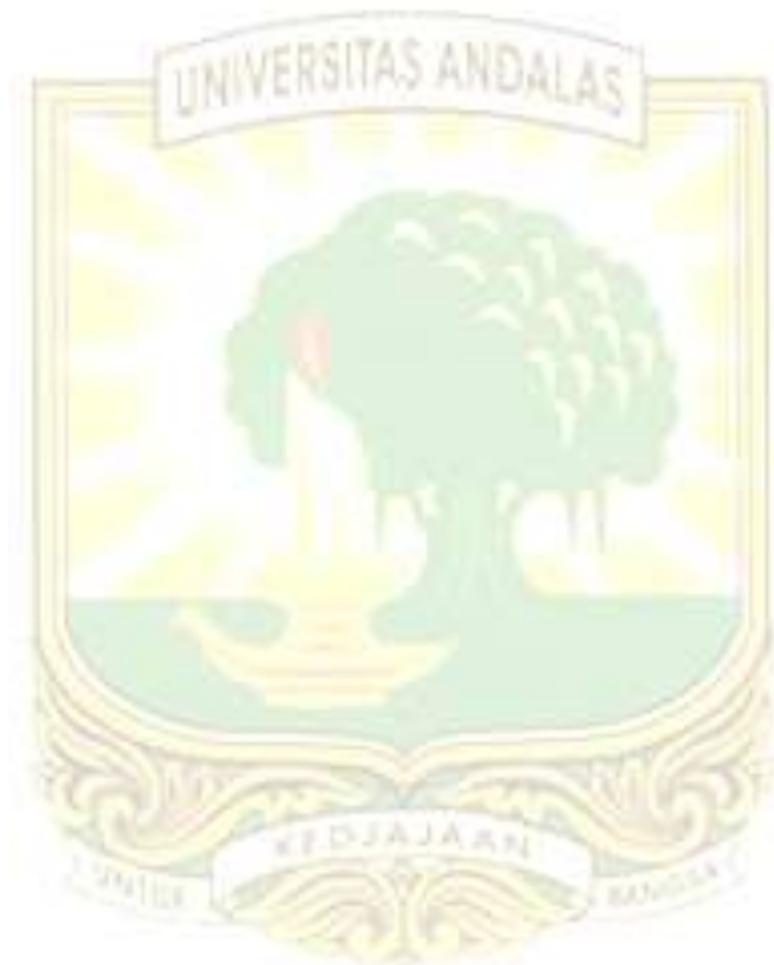
**Tabel 6. Nilai Rf dari profil metabolit sekunder bakteri menggunakan kromatografi lapis tipis dengan eluen heksan : etil asetat (2.5 : 7.5)**

<u>Kode Maserat</u>	<u>Noda</u>	<u>Rf</u>
ADB <u>2.2</u>	<u>1</u>	0,46
	<u>2</u>	0,52
ADB <u>3</u>	<u>1</u>	0,16
	<u>2</u>	0,38
	<u>3</u>	0,40
	<u>4</u>	0,52
	5	0,72
	6	0,80

**Tabel 7. Nilai Rf dari profil metabolit sekunder bakteri menggunakan kromatografi lapis tipis dengan eluen toluen : etil asetat : asam format (7 : 2.5 : 0.5)**

<u>Kode Maserat</u>	<u>Noda</u>	<u>Rf</u>
ADB <u>2.2</u>	<u>1</u>	0,50
	<u>2</u>	0,54
	<u>3</u>	0,76
	4	0,84

ADB <u>3</u>	<u>1</u>	0,50
	<u>2</u>	0,56
	<u>3</u>	0,64
	<u>4</u>	0,74
	5	0,82



## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Hasil isolasi ditemukan delapan isolat bakteri berbeda. Dari delapan isolat ini, semuanya memiliki aktivitas antibiotik. Selanjutnya ditemukan dua isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibiotik sangat potensial, ditandai dengan kode ADB 2.2 dan ADB 3 terhadap bakteri uji *S. aureus* ATCC 25923, *S. mutans* ATCC 25175, *P. aeruginosa* ATCC 27853 dan *E. coli* ATCC 25922. Diameter hambatan terbesar dihasilkan oleh isolat ADB 2.2 terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan isolat ADB 3 terhadap bakteri *S. mutans* ATCC 25175 dengan diameter hambatan > 30 mm.
2. Karakteristik isolat bakteri yang potensial sebagai antibiotik terlihat pada uji makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia. Dari pengujian ini didapatkan empat genus bakteri, yaitu *Enterobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp.

#### 5.2 Saran

Disarankan kepada peneliti selanjutnya untuk melakukan :

1. Identifikasi isolat bakteri yang sangat potensial menghasilkan antibiotik secara molekuler dengan menggunakan 16S rRNA, sehingga diketahui spesies dari bakteri tersebut.
2. Identifikasi senyawa metabolit sekunder yang berperan dalam aktivitas antibiotik yang sangat potensial dengan metode NMR, sehingga diperoleh struktur senyawa yang dapat dijadikan sebagai antibiotik.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Sudha S, M MS. Characterization of cytotoxic compound from marine sediment derived *Actinomycete Streptomyces avidinii* strain SU4. In: Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Elsevier; 2012. p. 770–3.
2. Alen Y, Melati A, Sarina G, Djamaan A. Isolation of secondary metabolite *Aspergillus niger* “ In-Habiting ” queen *Macrotermes gilvus* Hagen’s nest. Indones J Pharm Sci Technol. 2018;5(2).
3. Craney A, Ahmed S, Nodwell J. Towards a new science of secondary metabolism. J Antibiot (Tokyo). 2013;66:387–400.
4. Utami ER. Antibiotika, resistensi, dan rasionalitas terapi. El-Hayah. 2011;1(4):191–8.
5. Kementerian Kesehatan RI. Penggunaan Antibiotik Bijak dan Rasional Kurangi Beban Penyakit Infeksi [Internet]. [cited 2018 Des 2]. Available from: <http://www.depkes.go.id/article/print/15081100001/penggunaan-antibiotik%0A-bijak-dan-rasional-kurangi-beban-penyakit-infeksi.html>.
6. Putri AS, Purba FF, Kusuma IW, Kuspradini H. Chemical compositions and antimicrobial potential of *Actinodaphne macrophylla* leaves oils from East Kalimantan. Int Conf Trop Stud Its Appl. 2018;144:1–7.
7. Djamaan A, Asia, Wahyuni R. Isolasi mikroba endofit dari kulit batang, daun, dan kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) pengkulturan serta uji aktivitas antimikrobanya. J Farm Higea. 2014;6(1).
8. Forqan B. Fenomena pertambangan batubara di kalimantan selatan: kebijakan kuras habis dan orientasi pasar. 2005;
9. Kurniawan SB, Purwanti IF, Titah HS. The effect of pH and aluminium to bacteria isolated from aluminium recycling industry. J Ecol Eng. 2018;19(3):154–61.
10. Organization WH. Top 10 Causes of Death [Internet]. 2014 [cited 2018 Nov 11]. Available from: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/).
11. Zhang H, Wang Y, Chen S, Zhao Z, Feng J, Zhang Z, Lu K, Jia J. Water bacterial and fungal community compositions associated with urban lakes, Xi’an, China. Int J Environ Res Public Heal Artic. 2018;

12. Odonkor ST, Addo KK. Bacteria resistance to antibiotics : recent trends and challenges. In: International Journal of Biological & Medical Research. BioMedSciDirect Publications; 2011. p. 1204–10.
13. Flynn WT. The judicious use of medically important antimicrobial drugs in food-producing animals. In Food and Drug Administration; 2012.
14. Lihan S, Lin CS, Ahmad I, Sinang FM, Hua NK, Sallehin AA. Antimicrobial producing microbes isolated from soil samples collected from Nanga Merit Forest in Sarawak, Malaysian Borneo. Eur J Exp Biol. 2014;4(1):494–501.
15. Mohamad OA, Li L, Ma J-B, Hatab S, Xu L, Guo J-W. Evaluation of the antimicrobial activity of endophytic bacterial populations from Chinese traditional medicinal plant licorice and characterization of the bioactive secondary metabolites produced by *Bacillus atrophaeus* Against *Verticillium dahliae*. In: Frontiers in Microbiology. PubMed; 2018. p. 1–14.
16. Matobole RM, Van Zyl LJ, Parker-Nance S, Davies-Coleman MT, Trindade M. Antibacterial activities of bacteria isolated from the marine sponges *Isodictya compressa* and *Higginsia bidentifera* collected from Algoa Bay, South Africa. In: Marine Drugs. PubMed; 2017. p. 1–19.
17. Tortorella E, Tedesco P, Esposito FP, January GG, Fani R, Jaspars M, de Pascale D. Antibiotics from deep-sea microorganisms: current discoveries and perspectives. Mar Drugs. 2018;16(10):1–16.
18. Leekha S, Terrell CL, Edson RS. General principles of antimicrobial therapy. 2011;86:156–67.
19. Nemeth J, Oesch G, Kuster SP. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2015;382–95.
20. Etebu E, Arikekpar I. Antibiotics: classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. Int J Appl Microbiol Biotechnol Res. 2016;4:90–101.
21. Mohamad NA, Jusoh NA, Htike ZZ, Win SL. Bacteria identification from microscopic morphology: a survey. Int J Soft Comput Artif Intell Appl. 2014;3(2).
22. Harti A. Mikrobiologi Kesehatan: Peran Mikrobiologi Dalam Bidang Kesehatan. Yogyakarta: Penerbit Andi; 2015.

23. Sanders ER. Aseptic laboratory techniques : plating methods. *J Vis Exp.* 2012;1–18.
24. Alam MZ, Aqil F, Ahmad I, Ahmad S. Incidence and transferability of antibiotic resistance in the enteric bacteria isolated from hospital wastewater. *Brazilian J Microbiol.* 2013;806:799–806.
25. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. 2004;2.
26. Wu W, Yongxing J, Fang B, Shouguang J. *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medicinal Microbiology* (2nd Edition); 2015. 753-767 p.
27. Yang L, Hu Y, Liu Y, Zhang J, Ulstrup J, Molin S. Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. In: *Environmental Microbiology*. Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing; 2011. p. 1705–17.
28. Radji M. *Buku Ajar Mikrobiologi: Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*. Jakarta: EGC; 2011.
29. DeLeo F, Diep B, Otto M. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Natl Institutes Heal.* 2010;23(1):1–17.
30. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, Leeuwen W Van, Belkum A Van, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. 2005;5:751–62.
31. Whiley R, Beighton D. Current classification of the oral Streptococci. *Oral Microbiol Immunol.* 2013;13:195–216.
32. Seymour R, Lowry R, Whitworth J, Martin M. Infective endocarditis, dentistry and antibiotic prophylaxis; time for a rethink? *Br Dent J.* 2000;189(11):610–6.
33. Djamaan A. *Konsep Produksi Biopolimer P(3HB) dan P(3HB-Ko-3HV) Secara Fermentasi*. Padang: Andalas University Press; 2011.
34. Martokusumo W. *Mendaur Ulang Kota Sawahlunto. Sekolah Arsitektur, Perencanaan dan Pengembangan Kebijakan*. Bandung: ITB; 2007.
35. Linggadipura R, Apriliani A, Trilarasati H, Rajagukguk Y. Strategi pengembangan air asam tambang menjadi potensi geowisata danau biru di sawahlunto, sumatera barat. *Semin Nas AVoER IX.* 2017;

36. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 492/Menkes/Per/IV/2010 tentang Persyaratan Kualitas Air Minum. 2010.
37. Choma IM, Grzelak EM. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *J Chromatogr A*. 2011;1218(19):2684–91.
38. Haditomo AHC, Desrina, Sarjito, Prayitno SB. Probiotic candidates from fish pond water in Central Java Indonesia. *Conf Ser Earth Environ Sci*. 2018;
39. Nn A. Medicinal & aromatic plants a review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. In: *Medical & Aromatic Plants*. OMICS Publishing Group; 2015. p. 3–8.
40. Dinas Kesehatan Republik Indonesia. Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat. 2000;
41. Istiqomah. Perbandingan metode ekstraksi maserasi dan sokletasi terhadap kadar piperin buah cabe jawa (*Piperis retrofracti* fructus). [Skripsi]. Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Kesehatan. 2013;
42. Cai L. Thin layer chromatography. In: *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Wiley Online Library; 2014.
43. Gandjar I, Rohman A. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar; 2007. 419-425 p.
44. Rohman A. *Kromatografi untuk Analisis Obat*. Ilmu G, editor. Yogyakarta; 2009.
45. Tomita F. Endophytes in southeast asia and japan: their taxonomic diversity and a potential applications. *Fungal Divers*. 2003;14:187–204.
46. Djamaan A, Agustien A, Yuni D. Isolasi bakteri endofit dari tumbuhan surian (*Toona sureni* Blume Merr.) yang berpotensi sebagai penghasil antibakteri. *J Bahan Alam Indones*. 2012;8(1).
47. Rendowaty A, Djamaan A, Handayani D. Waktu kultivasi optimal dan aktivitas antibakteri dari ekstrak etil asetat jamur simbion *Aspergillus unguis* (WR8) dengan *Haliclona fascigera*. *J Sains Farm Klin*. 2017;4(2):49–54.
48. Cappuccino J, Sherman N. *Microbiology: A Laboratory Manual*. 10th Ed. New York: Pearson; 2014.

49. Varghese N, JP. P. Microbiology Laboratory Manual. Kerala: Kerala Agricultural University; 2014.
50. Acharya T. Decarboxylation test: types, uses, principles, procedure and results [Internet]. 2015 [cited 2019 Jan 23]. Available from: <https://microbeonline.com/decarboxylation-test-types-uses-principles-procedure-results/>
51. Wilson G. Virtual Unknown Microbiology. Texas: Intuitive Systems, Inc; 2012.
52. England PH. UK Standards for Microbiology Investigations: Aesculin Hydrolysis Test. London: Assets Publishing; 2018.
53. Natrana KD. Isolasi Antibiotik dari Bakteri *Bacillus cereus* (A1) Symbion Spon Laut *Haliclona fascigera* dan Uji Aktivitas terhadap *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Andalas. 2017.
54. Pumipuntu N, Kulpeanprasit S, Santajit S, Tunyong W, Kong-ngoen T, Hinthong W, Indrawattana N. Screening method for *Staphylococcus aureus* identification in subclinical bovine mastitis from dairy farms. *Vet World*. 2017;10(7):721–6.
55. Merck. Pseudomonas selective agar, base (Cetrimide Agar). 2008;49(1965):1–3.
56. Saline (0.85%). remel. 2010;
57. Agustien A, Djamaan A, Rilda Y, Nasir N, Manis KL. Isolation and characterization of antibacterial endophytic bacteria from mangrove plants at kapo-kapo and Setan islands, west sumatra indonesia. In *Der Pharma Chemica*; 2018. p. 26–30.
58. Jannah M, Agustien A, Zam SI, Lalfari RS, Aldi Y, Dewi AP, Djamaan A. Isolation and characterization of antibiotic-producing endophytic bacteria from *Citrus aurantifolia* swingle. *J Pure Appl Microbiol*. 2018;12(3):1473–81.
59. Zapata A, Ramirez-arcos S. A comparative study of McFarland turbidity standards and the densimat photometer to determine bacterial cell density. In: *Current Microbiology*. Springer; 2015.
60. J M. McFarland standard. In *Dalynn Biologicals*; 2014.

61. Agustien A, Santoso P, Sari NP, Annisa F. Screening of endophyte *Piper betle* bacteria from the Forests of HPPB university andalas as antibiotics producer. In: International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. Excellent Publisher; 2017. p. 3970–5.
62. Putri DM. Isolasi, Karakterisasi dan Uji Aktivitas Antibiotik Bakteri Endofit dari Tumbuhan Eceng Gondok [*Eichhornia crassipes* (Mart.)] di Danau Maninjau, Sumatera Barat.[Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Andalas. 2017.
63. Rivai H, Asia A, Rina W, Alen Y, Handayani D, Aldi Y, Marlina, Djamaan A. Isolation of endophytic bacteria from bark, leaf, and pericarp of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) and testing of the antimicrobial activity . Res J Pharm Biol Chem Sci. 2016;7(1):1910–20.
64. Ardiansyah. Daun Beluntas sebagai Antibakteri dan Antioksidan. Artikel IPTEK. Bidang Biologi, Pangan dan Kesehatan; 2009.
65. Voytsekhovskaya IV, Axenov-gribanov DV, Murzina SA, Pekkoeva SN, Protasoy ES, Gamaiunov SV, Timoveyef MA. Estimation of antimicrobial activities and fatty acid composition of actinobacteria isolated from water surface of underground lakes from Badzheyskaya and Okhotnichya caves in Siberia. PeerJ. 2018;
66. Suriawiria U. Mikrobiologi Dasar. Jakarta: Papas Sinar Sinanti; 2005.
67. Cheesbrough M. District Laboratory Practice in Tropical Countries (2nd Edition). Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2006.
68. Hemraj V, Diksha S, Avneet G. A review on commonly used biochemical test for bacteria. In: Innovare Journal of Life Science. Innover Academic Sciences; 2013. p. 1–7.
69. Volk W, Wheeler M. Mikrobiologi Dasar, Jilid 1 (Ed. V). Jakarta: Erlangga; 1993.
70. Sawian P, Nongkynrih KJ, Anand U, Charan AA. Biochemical tests performed for the identification of the isolates collected from local rice beer (Kiad). J Pharmacogn Phytochem. 2018;7(1):395–7.
71. Alfadil NAA, Mohamed MS, Ali MM, Nima EAI. Characterization of pathogenic bacteria isolated from sudanese banknotes and determination of their resistance profile. In: International Journal of Microbiology. Hindawi; 2018. p. 1–7.

72. Kus J. Infections due to citrobacter and enterobacter. In: Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier; 2014.
73. Pal M. Is *Aeromonas hydrophila* a potential pathogen of food safety concern ? J Food Microbiol. 2018;2(1):3–4.
74. El-Gayar Ar KE. Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* from tap water. Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci. 2017;19(4):817–30.
75. Handschuh H, Ryan MP, O’Dwyer J, Adley CC. Assessment of the bacterial diversity of aircraft water: identification of the frequent fliers. Plos Pathog Antifung Imunity. 2017;
76. Sharon SFB, Kalidass S, Daniel RR. Qualitative analysis of antimicrobial compound by high performance thin layer chromatography method. Asian J Pharm Clin Res. 2013;6(4):117–20.
77. Arifa N. Isolasi dan Elusidasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Lichen Sumatera *Stereocaulon graminosum* serta Pengujian Aktivitas Antibakteri. [Skripsi]. Universitas Andalas. Padang; 2018.
78. Huneck S, Yoshimura I. Identification of lichen substances. verlag berlin heidelberg new york. In Springer; 1996.
79. Wahyuni, Ibrahim N, Nugrahani AW. Uji aktivitas antibakteri ekstrak serbuk gergaji kayu eboni (*Diospyros celebica* Bakh.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Biocelbes. 2018;12(1):54–64.
80. Nasr H, Abdel-Aziz MS, Radwan MO, Shaaban M. Bioactive secondary metabolites from terrestrial *Streptomyces baarnensis* MH4. Br J Pharm Res. 2015;5(1):72–81.

## Lampiran 1. Data Penelitian



Gambar 15. Lokasi Pengambilan sampel di Danau Biru Kota Sawahlunto.

## Lampiran 1. (Lanjutan)

Tabel 8. Daftar isolat bakteri dari air Danau Biru

<u>Kode Isolat</u>	<u>Jumlah Koloni Bakteri</u>	<u>Jumlah Sel Bakteri</u>
<u>ADB 1</u>	<u>13</u>	<u>1,3 x 10<sup>1</sup> CFU/ml</u>
<u>ADB 1.1</u>	<u>22</u>	<u>2,2 x 10<sup>1</sup> CFU/ml</u>
<u>ADB 2</u>	<u>27</u>	<u>2,7 x 10<sup>1</sup> CFU/ml</u>
<u>ADB 2.1</u>	<u>12</u>	<u>1,2 x 10<sup>1</sup> CFU/ml</u>
<u>ADB 2.2</u>	<u>19</u>	<u>1,9 x 10<sup>1</sup> CFU/ml</u>
<u>ADB 3</u>	<u>25</u>	<u>2,5 x 10<sup>1</sup> CFU/ml</u>
<u>ADB 4.1</u>	<u>8</u>	<u>8,0 x 10<sup>1</sup> CFU/ml</u>
<u>ADB 5.2</u>	<u>14</u>	<u>1,4 x 10<sup>1</sup> CFU/ml</u>

Keterangan: ADB= Air Danau Biru

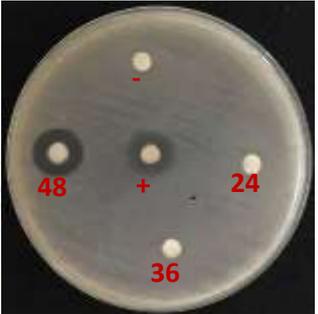
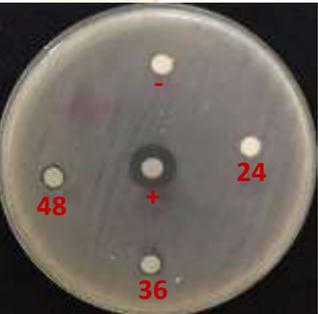
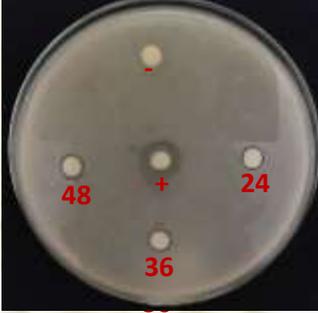
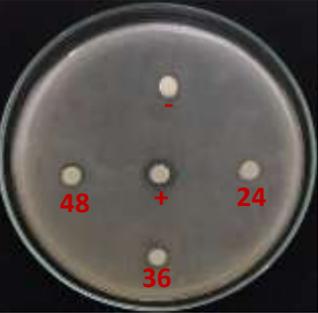
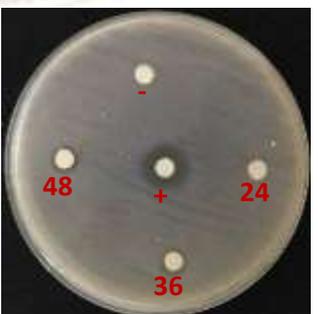
### Lampiran 1. (Lanjutan)

Tabel 9. Hasil pengamatan mikroskopis isolat bakteri dari air Danau Biru yang berpotensi sebagai penghasil antibiotik

<u>Kode Isolat</u>	<u>Pewarnaan Gram (+/-)</u>	<u>Bentuk Sel</u>
<u>ADB 1</u>	=	<u>Basil</u>
<u>ADB 1.1</u>	=	<u>Basil</u>
<u>ADB 2</u>	=	<u>Basil</u>
<u>ADB 2.1</u>	+	<u>Basil</u>
<u>ADB 2.2</u>	=	<u>Basil</u>
<u>ADB 3</u>	=	<u>Basil</u>
<u>ADB 4.1</u>	=	<u>Basil</u>
<u>ADB 5.2</u>	=	<u>Basil</u>

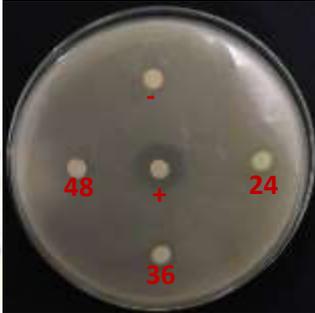
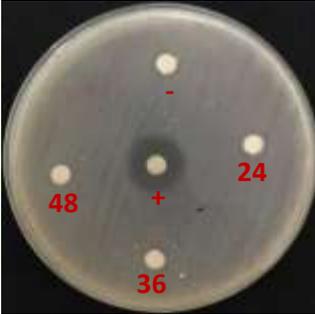
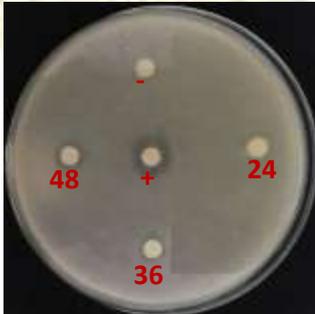
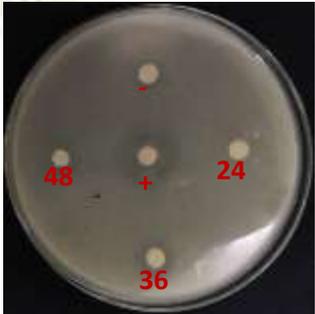
**Lampiran 1. (Lanjutan)**

Tabel 16. Hasil uji aktivitas antibiotik isolat bakteri ADB 1 dan ADB 1.1 dari air Danau Biru

Bakteri Uji	Isolat 1	Isolat 1.1
<p><u><i>Staphylococcus aureus</i></u> <u>ATCC 25923</u></p>		
<p><u><i>Streptococcus mutans</i></u> <u>ATCC 25175</u></p>		
<p><u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> <u>ATCC 27853</u></p>		
<p><u><i>Escherichia coli</i></u> <u>ATCC 25922</u></p>		

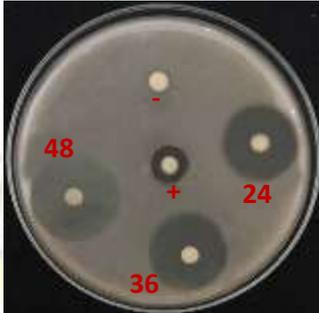
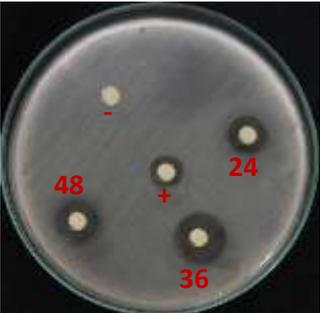
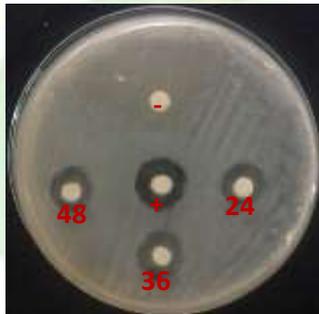
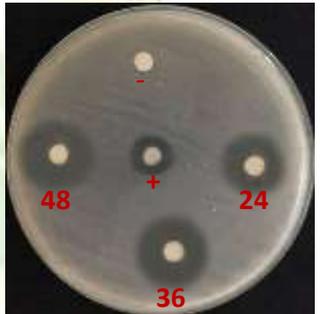
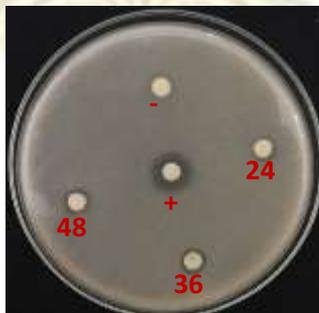
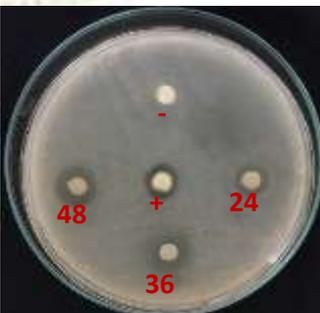
**Lampiran 1. (Lanjutan)**

Tabel 17. Hasil uji aktivitas antibiotik isolat bakteri ADB 2 dan ADB 2.1 dari air Danau Biru

Bakteri Uji	Isolat 2	Isolat 2.1
<p><u><i>Staphylococcus aureus</i></u> <u>ATCC 25923</u></p>		
<p><u><i>Streptococcus mutans</i></u> <u>ATCC 25175</u></p>		
<p><u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> <u>ATCC 27853</u></p>		
<p><u><i>Escherichia coli</i></u> <u>ATCC 25922</u></p>		

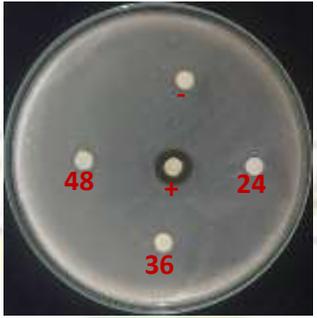
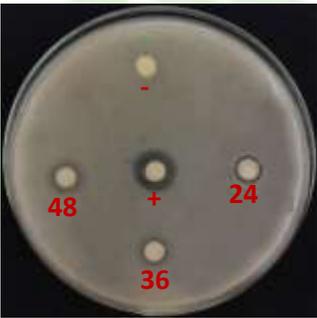
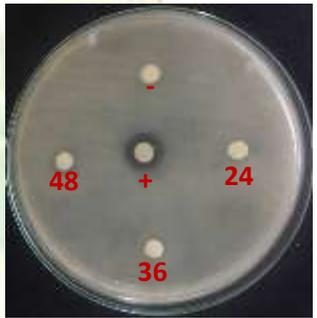
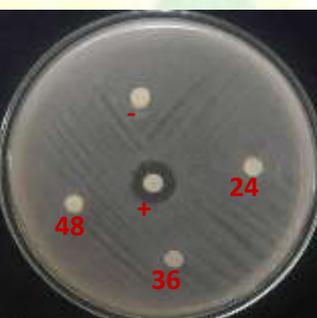
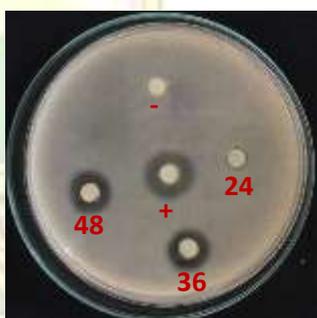
**Lampiran 1. (Lanjutan)**

Tabel 18. Hasil uji aktivitas antibiotik isolat bakteri ADB 2.2 dan ADB 3 dari air Danau Biru

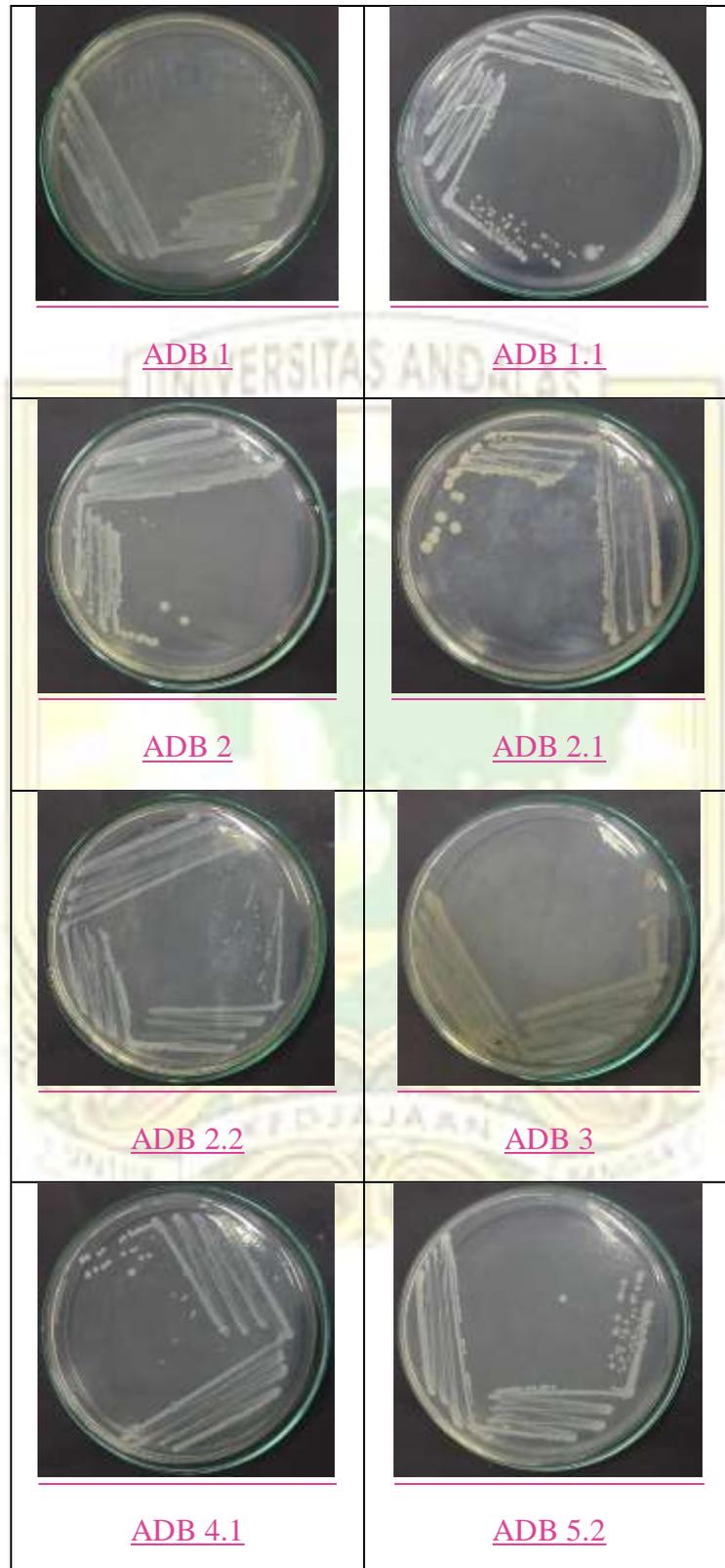
Bakteri Uji	Isolat 2.2	Isolat 3
<p><u><i>Staphylococcus aureus</i></u> <u>ATCC 25923</u></p>		
<p><u><i>Streptococcus mutans</i></u> <u>ATCC 25175</u></p>		
<p><u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> <u>ATCC 27853</u></p>		
<p><u><i>Escherichia coli</i></u> <u>ATCC 25922</u></p>		

**Lampiran 1. (Lanjutan)**

Tabel 19. Hasil uji aktivitas antibiotik isolat bakteri ADB 4.1 dan ADB 5.2 dari air Danau Biru

Bakteri Uji	Isolat 4.1	Isolat 5.2
<p><u><i>Staphylococcus aureus</i></u> <u>ATCC 25923</u></p>		
<p><u><i>Streptococcus mutans</i></u> <u>ATCC 25175</u></p>		
<p><u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> <u>ATCC 27853</u></p>		
<p><u><i>Escherichia coli</i></u> <u>ATCC 25922</u></p>		

Lampiran 1. (Lanjutan)



Gambar 16. Pengamatan makroskopis isolat bakteri dari air Danau Biru

**Lampiran 1. (Lanjutan)**



**KEMENTERIAN PERTANIAN  
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAK AND KESIHATAN HEWAN  
BALAI VETERINER BUKITTINGGI**

Jl. RAYA BUKITTINGGI - PAYAKUMBUH KM. 14 BASO POBOX. 35  
 Telepon : (0752) 28300 FAKSIMILI : (0752) 28280  
 E-Mail : bpv2\_bukittinggi@yahoo.co.id

E-Mail : infovetbvetbukittinggi@gmail.com  
 Website : bvvetbukittinggi.ditjenmak.deptan.go.id

---

No. Surat : 27012 /PK.310/F4B.1/11/2018  
 Lampiran :  
 Perihal : Hasil Uji Laboratorium  
 Tgl Kirim / No : 21 November 2018 /0  
 Tgl Terima : 21 November 2018  
 No EPI : P02180761  
 Jenis Layanan : Penelitian  
 Input Data : ERDI

**KEPADA YTH:**  
**MARHANI DWITHANIA**  
 Kal. Limau Manis Kec. Pauh Kota Padang  
**Padang**

---

**Hasil uji**

No	Kecamatan	Desa	Pemilik	Lab Uji	Jenis Uji	Jum	Pos	Neg	Sero+	Sero-	Lainnys
1.	Pauh	Limau Manis	Marhani Dwithania	Bakteriologi	Identifikasi Bakteri	8	8	0	0	0	0

**Catatan:**  
 ENTEROBACTER SP (2)  
 AEROMONAS SP (4)  
 PSEUDOMONAS SP (1)  
 BACILLUS SP (1)



**BALAI VETERINER BUKITTINGGI**  
 Melawan Kopala Balai,  
 Drh. **FITRIA, M.Biomed**  
 NIP. 19780712 200112 2 001

Bukittinggi, 27 November 2018  
 Manajer Teknis,  
  
 Drh. **RUDI HARSANUGROHO, M.Biomed**  
 NIP. 19690901 199903 1 002

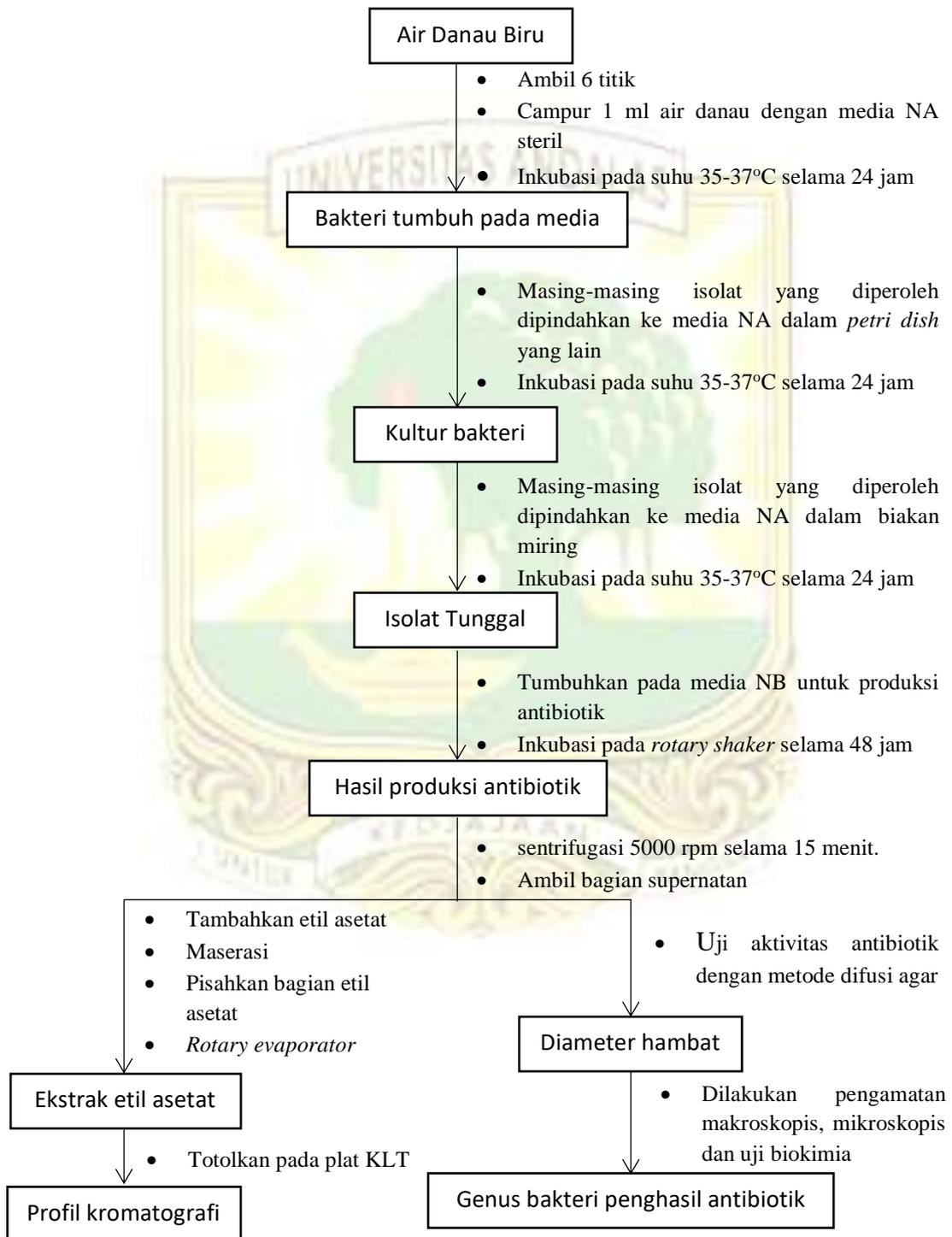
**Tembusan:**  
 1. Direktur Kesehatan Hewan di Jakarta  
 2. Ka. Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Propinsi Sumatera Barat  
 3. Arsip

**Lampiran Hasil Pengujian No Epi.P02180761**

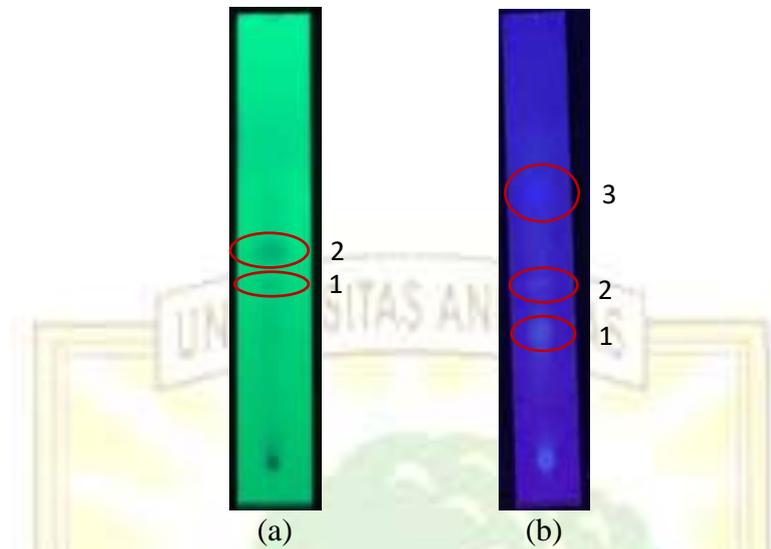
No	Kode	Pemilik	Hewan	Kabupaten/Kota	Kecamatan	Desa	Hasil Uji
8	ADB 1	Marhani Dwithania	Isolat	Padang	Pauh	Limau Manis	Enterobacter sp
7	ADB 1.1	Marhani Dwithania	Isolat	Padang	Pauh	Limau Manis	Enterobacter sp
3	ADB 2	Marhani Dwithania	Isolat	Padang	Pauh	Limau Manis	Aeromonas sp
2	ADB 2.1	Marhani Dwithania	Isolat	Padang	Pauh	Limau Manis	Bacillus sp
4	ADB 2.2	Marhani Dwithania	Isolat	Padang	Pauh	Limau Manis	Aeromonas sp
6	ADB 3	Marhani Dwithania	Isolat	Padang	Pauh	Limau Manis	Pseudomonas sp
5	ADB 5.2	Marhani Dwithania	Isolat	Padang	Pauh	Limau Manis	Aeromonas sp
1	ADB 4.1	Marhani Dwithania	Isolat	Padang	Pauh	Limau Manis	Aeromonas sp

Gambar 17. Hasil uji biokimia dari Laboratorium Balai Penyidik dan Pengujian Veteriner Regional II Bukittinggi, Provinsi Sumatera Barat

**Lampiran 2. Skema Kerja Penelitian**

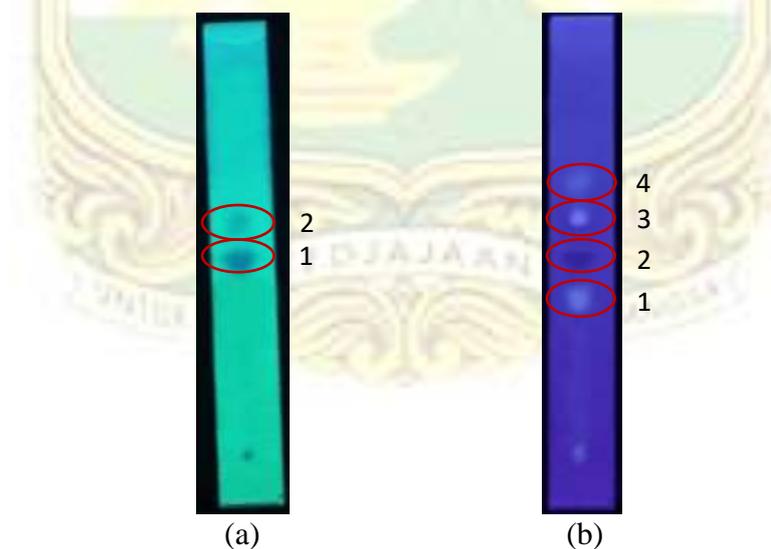


## Lampiran 2. Gambar Penelitian



Gambar 18. Profil kromatografi metabolit sekunder ekstrak etil asetat isolat bakteri ADB 2.2 dari air Danau Biru dengan eluen heksan : etil asetat (2.5 : 7.5)

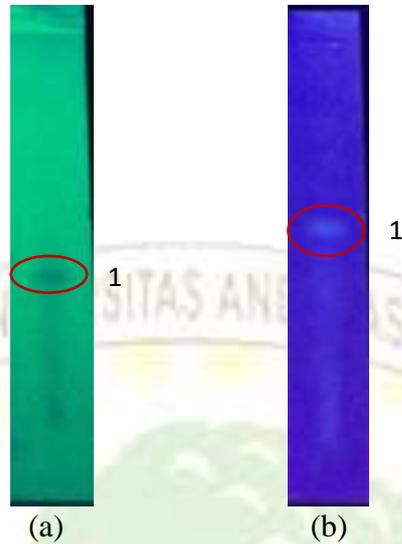
Keterangan: (a) Terdapat dua noda dengan UV 254 nm  
(b) Terdapat tiga noda dengan UV 366 nm



Gambar 19. Profil kromatografi metabolit sekunder ekstrak etil asetat isolat bakteri ADB 3 dari air Danau Biru dengan eluen heksan : etil asetat (2.5 : 7.5)

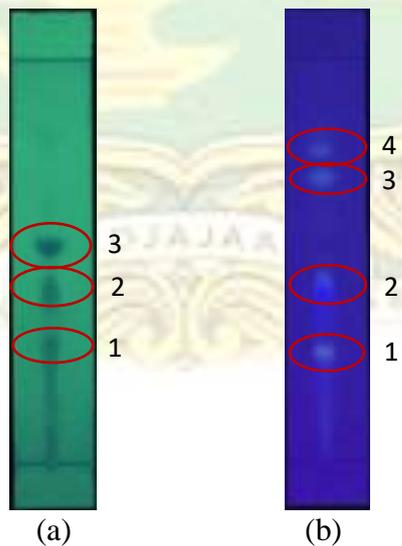
Keterangan: (a) Terdapat dua noda dengan UV 254 nm  
(b) Terdapat empat noda dengan UV 366 nm

**Lampiran 2. (Lanjutan)**



Gambar 20. Profil kromatografi metabolit sekunder ekstrak etil asetat isolat bakteri ADB 2.2 dari air Danau Biru dengan eluen toluen : etil asetat : asam format (7 : 2.5 : 0.5)

Keterangan: (a) Terdapat satu noda dengan UV 254 nm  
(b) Terdapat satu noda dengan UV 366 nm



Gambar 21. Profil kromatografi metabolit sekunder ekstrak etil asetat isolat bakteri ADB 3 dari air Danau Biru dengan eluen toluen : etil asetat : asam format (7 : 2.5 : 0.5)

Keterangan: (a) Terdapat tiga noda dengan UV 254 nm  
(b) Terdapat empat noda dengan UV 366 nm

### Lampiran 2. (Lanjutan)



Gambar 22. Hasil uji biokimia

Keterangan:

1 : Uji TSIA

2 : Mortilitas

3 : Urea

4 : Sitrat

5 : Laktosa

6 : Glukosa

7 : Sakarosa

8 : Manitol

9 : Metyl Red (MR)

10 : Vogesprokuer (VP)

13 : KCN

14 : Arginin

15 : Lysin

16 : Ornithin

17 : Phenilalanin

18 : Aeskulin

19 : Arabinosa

20 : Raffinosa

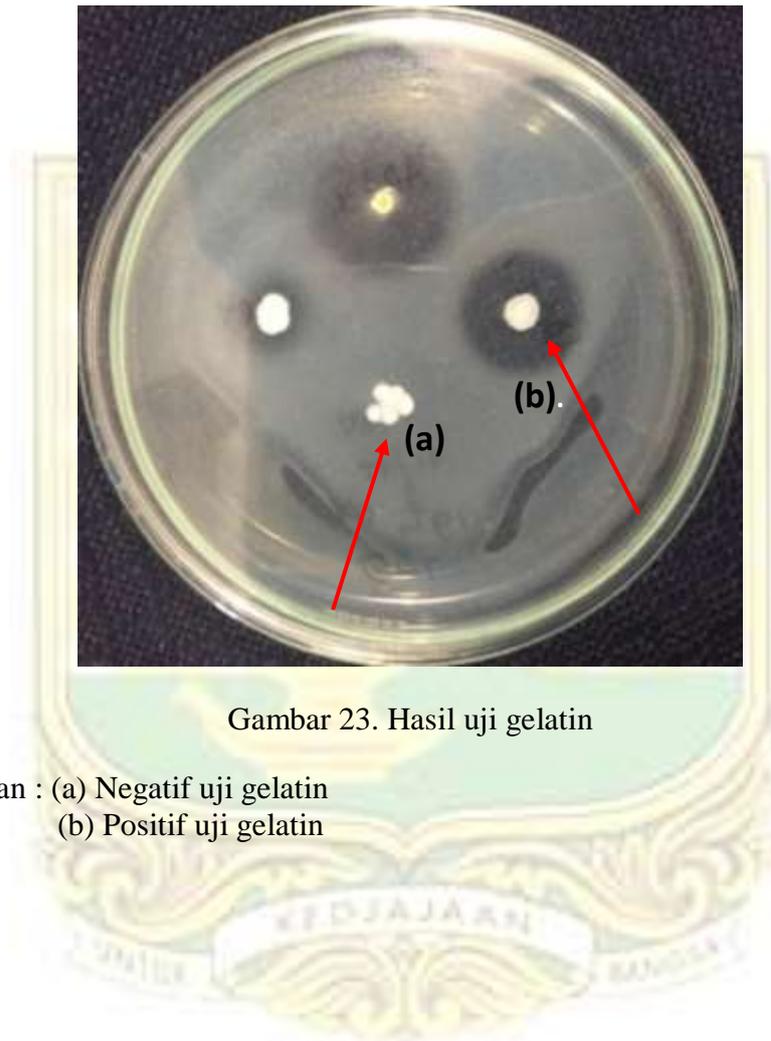
21 : Sorbitol

22 : Trehalase

11 : Oksidase  
12 : Fermentasi

23 : Dulcitol  
24 : Xylosa

### Lampiran 2. (Lanjutan)



Gambar 23. Hasil uji gelatin

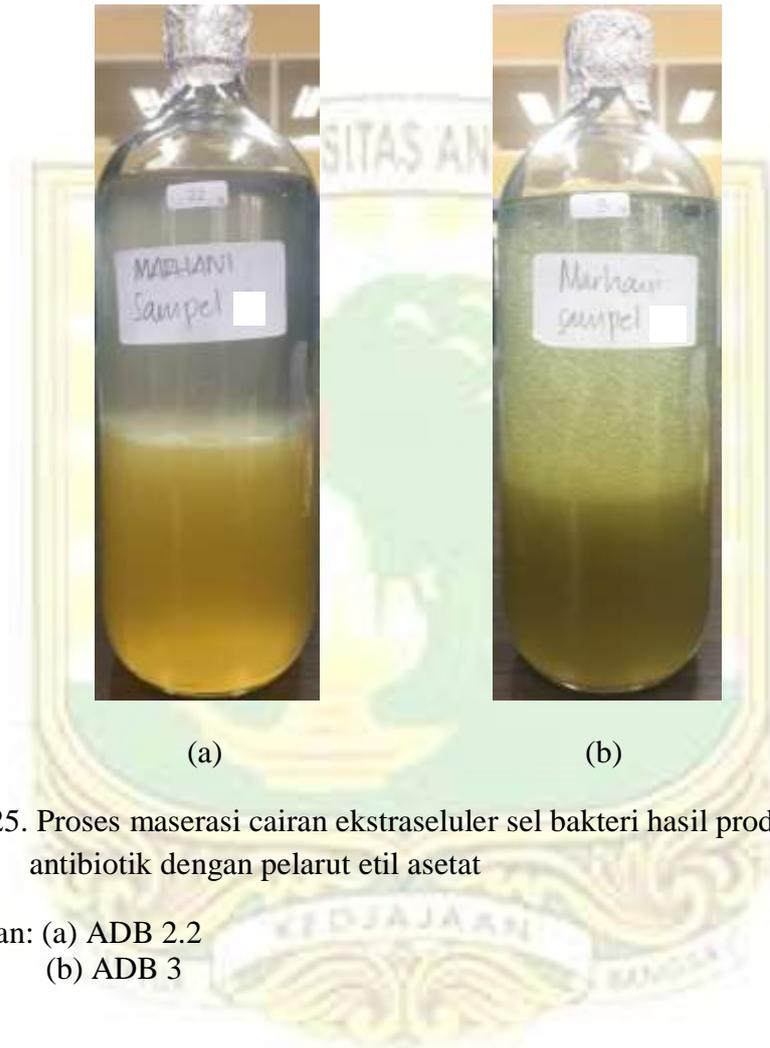
Keterangan : (a) Negatif uji gelatin  
(b) Positif uji gelatin

Lampiran 2. (Lanjutan)



Gambar 24. Peremajaan bakteri uji

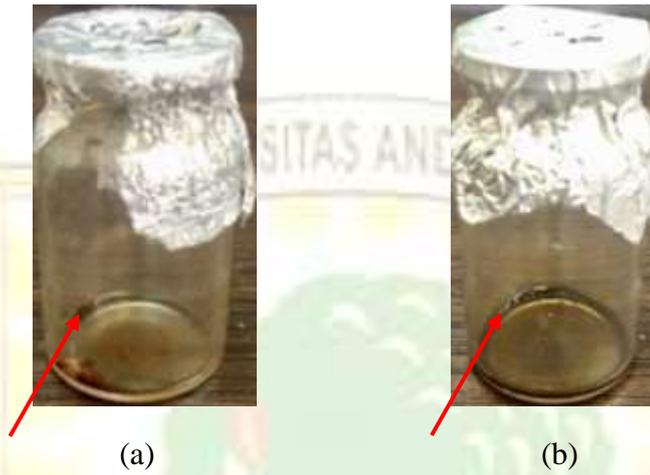
**Lampiran 2. (Lanjutan)**



Gambar 25. Proses maserasi cairan ekstraseluler sel bakteri hasil produksi antibiotik dengan pelarut etil asetat

Keterangan: (a) ADB 2.2  
(b) ADB 3

## Lampiran 2. (Lanjutan)



Gambar 26. Ekstrak etil asetat

Keterangan : (a) ADB 2.2 sebanyak 0,021 gram  
(b) ADB 3 sebanyak 0,046 gram