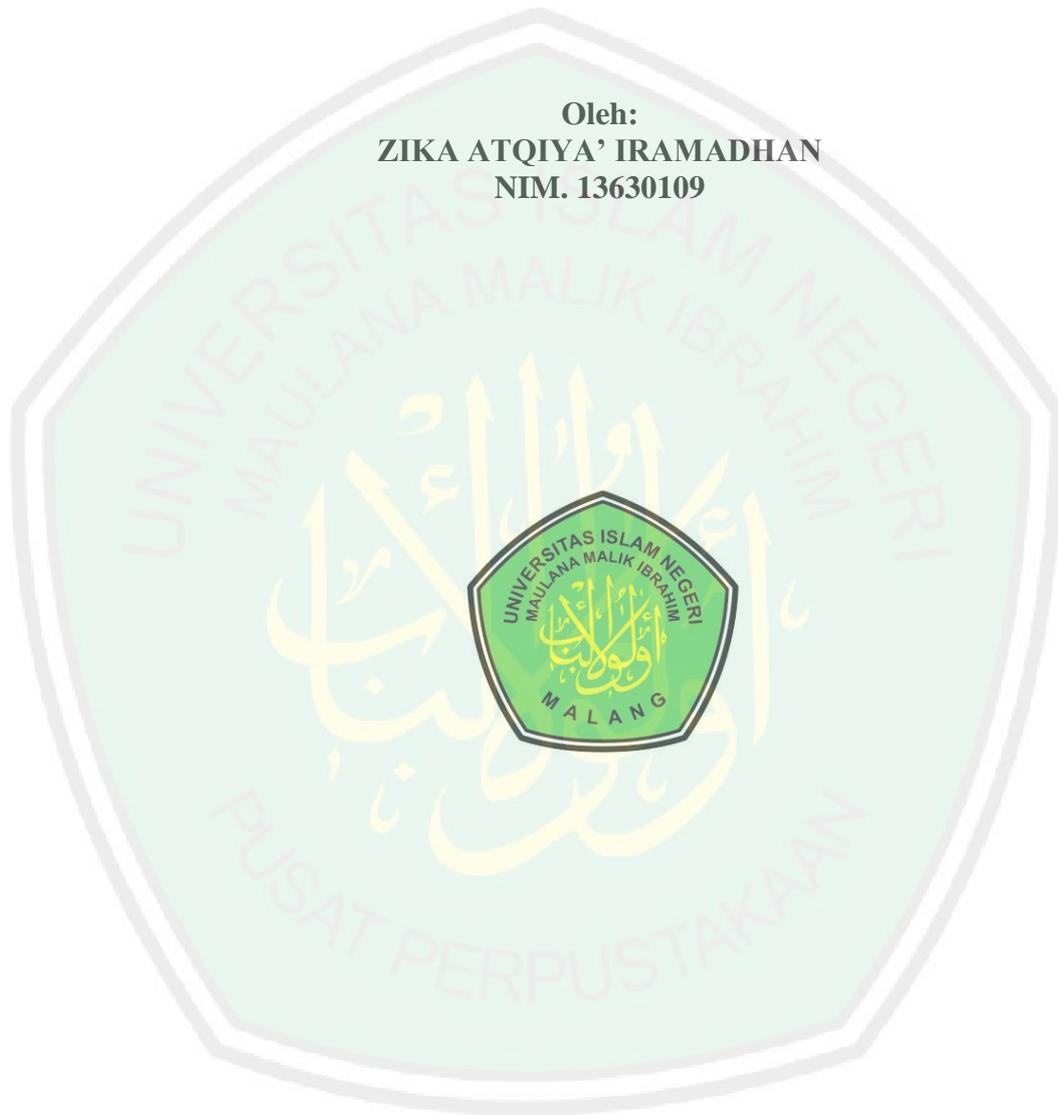


**ISOLASI BAKTERI ENDOFIT DARI AKAR TANAMAN PLETEKAN
(*Ruellia tuberosa L*) DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI**

SKRIPSI

Oleh:
ZIKA ATQIYA' IRAMADHAN
NIM. 13630109



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

**ISOLASI BAKTERI ENDOFIT DARI AKAR TANAMAN PLETEKAN
(*Ruellia tuberosa L*) DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI**

SKRIPSI

Oleh:
ZIKA ATQIYA' IRAMADHAN
NIM. 13630109

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S. Si)

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018

**ISOLASI BAKTERI ENDOFIT DARI AKAR TANAMAN PLETEKAN
(*Ruellia tuberosa L*) DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI**

SKRIPSI

Oleh:
ZIKA ATQIYA' IRAMADHAN
NIM. 13630109

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 08 Februari 2018

Pembimbing I

Anik Maunatin, S.T, M.P
NIPT. 20140201 2 412

Pembimbing II

Nur Aini, M.Si
NIDT. 19840608 20160801 2 070



Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia

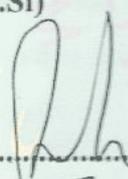
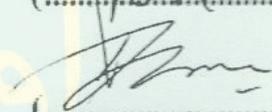
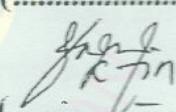
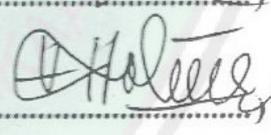
Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**ISOLASI BAKTERI ENDOFIT DARI AKAR TANAMAN PLETEKAN
(*Ruellia tuberosa* L) DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI**

SKRIPSI

Oleh:
ZIKA ATQIYA' IRAMADHAN
NIM. 13630109

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 08 Februari 2018

Penguji Utama	: <u>Elok Kamilah Hayati, M.Si</u> NIP. 19790620 200604 2 002	(..... )
Ketua Penguji	: <u>Akyunul Jannah, S.Si M.P</u> NIP. 19750410 200501 2 009	(..... )
Sekretaris Penguji	: <u>Anik Maunatin, S.T M.P</u> NIPT. 20140201 2 412	(..... )
Anggota Penguji	: <u>Nur Aini, M.Si</u> NIDT. 19840608 20160801 2 070	(..... )



Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia

Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**SURAT PERNYATAAN
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Zika Atqiya' Iramadhan
NIM : 13630109
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Isolasi Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Pletakan
(*Ruellia tuberosa L*) dan Uji Aktivitas Antibakteri

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 08 Februari 2018

Yang membuat pernyataan,



Zika Atqiya' Iramadhan

NIM. 13630109



MOTTO

Manusia bukan sebuah binatang ataupun tanaman
Manusia bisa memilih sesuatu, namun sukses itu dipilih
Sukses hanya ada ditangan Tuhan

“Tuhan adalah milik kita, sukses bersama merupakan kunci mencapai sukses
ditangan Tuhan”

PERSEMBAHAN

Skripsi ini dipersembahkan untuk kedua orang tua ku (**Ismunal Fiyah** dan **Musta'in A.Ma (Alm)**), dan keluarga besarku, 11 saudara yang selalu memberi kebahagiaan disamping mereka. Teruntuk orang tua ku, Aku tidak pernah tahu apa yang telah Engkau lakukan untuk kebaikan ku, namun Aku pernah mendengar bahwa Engkau selalu berusaha memenuhi segala keinginan ku, meskipun Engkau tidak punya apapun. Engkau selalu berdoa untuk kebaikan ku. Aku memohon maaf, Aku tidak mampu menghapus air mata mu ketika Engkau menangis, menemanimu ketika Engkau sakit dan menggenggam tangan mu untuk menenangkan mu.

**-Ich liebe dich meine Mutter-
- Ich liebe dich meine Mutter -
- Ich liebe dich meine Mutter -
- Ich liebe dich meine Vater -**

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil'alamin, Syukur alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “**Isolasi Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Pletakan (*Ruellia tuberosa L*) dan Uji Aktivitas Antibakteri**”. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada baginda rasul Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya.

Penulis haturkan ucapan terimakasih seiring do'a dan harapan *jazakumullah ahsanal jaza'* kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian laporan hasil penelitian ini. Ucapan terimakasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Anik Maunatin, S.T, M.P, sebagai dosen pembimbing yang telah sabar memberikan bimbingan, arahan dan memberikan waktu untuk membimbing penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan Rahmat-Nya kepada beliau dan keluarga. Amin.
5. Akyunul Jannah, S.Si, M.P, sebagai dosen konsultan yang memberikan arahan serta pandangan pada hasil penelitian sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.

6. Nur Aini, M.Si, sebagai dosen pembimbing agama yang selalu memberikan arahan serta bimbingan sains dari perspektif Islam sehingga penulis dapat mengambil pelajaran dari setiap proses penyelesaian skripsi ini.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas bantuan dan pemikirannya. Akhir kata, penulis berharap skripsi ini bisa memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca pada umumnya serta menambah khasanah ilmu pengetahuan. Amin Ya Rabbal A'lamiiin.

Malang, 08 Februari 2018

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
MOTTO	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
1.5 Batasan Masalah.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Tanaman Pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L)	8
2.2 Kandungan Kimia Tanaman Pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L)	9
2.3 Khasiat Tanaman Pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L)	10
2.4 Bakteri Endofit	11
2.4.1 Interaksi Bakteri Endofit dengan Tanaman Inang.....	13
2.5 Isolasi Mikroba	14
2.6 Pewarnaan Gram	15
2.7 Pewarnaan Endospora	18
2.8 Uji Katalase.....	18
2.9 Kurva Pertumbuhan	19
2.10 Bakteri Uji.....	20
2.10.1 Bakteri <i>Staphylococcus Aureus</i>	20
2.10.2 Bakteri <i>Escherichia Coli</i>	21
2.11 Antibakteri.....	22
2.12 Metode Uji Antibakteri	23
BAB III METODE PENELITIAN	25
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	25
3.2 Rancangan Penelitian	25
3.3 Alat dan Bahan Penelitian.....	25
3.3.1 Alat Penelitian.....	25
3.3.2 Bahan Penelitian.....	26
3.4 Tahapan Penelitian	26
3.5 Cara Kerja	26

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan	26
3.5.2 Pembuatan Media.....	27
3.5.2.1 Pembuatan Media NA (<i>Nutrien Agar</i>)	27
3.5.2.2 Pembuatan Media NB (<i>Nutrien Broth</i>)	27
3.5.3 Sterilisasi Permukaan Akar Tanaman Pletakan (<i>Ruellia tuberosa L</i>).....	27
3.5.4 Isolasi Bakteri Endofit Akar Tanaman Tanaman Pletakan (<i>Ruellia tuberosa L</i>) Metode Tempel (<i>peace plant</i>).....	28
3.5.5 Isolasi Bakteri Endofit Akar Tanaman Tanaman Pletakan (<i>Ruellia tuberosa L</i>) Metode Sebar (<i>spread plate</i>)	28
3.5.6 Pemurnian Isolat Bakteri Endofit.....	29
3.5.7 Identifikasi Bakteri Endofit Akar Tanaman Tanaman Pletakan (<i>Ruellia tuberosa L</i>)	29
3.5.7.1 Identifikasi Morfologi	29
3.5.7.2 Uji Katalase	30
3.5.7.3 Pewarnaan Gram	30
3.5.7.4 Pewarnaan Endospora	31
3.5.8 Pembuatan Inokulum Bakteri Uji.....	31
3.5.9 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Endofit	32
3.5.10 Produksi Metabolit Sekunder Bakteri Endofit Termodifikasi	32
3.5.11 Uji Aktivitas Antibakteri	32
3.6 Analisa Data	34
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Isolasi Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Pletakan (<i>Ruellia tuberosa L</i>)	35
4.2 Identifikasi Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletakan (<i>Ruellia tuberosa L</i>)	37
4.2.1 Uji Katalase	37
4.2.2 Pewarnaan Gram	39
4.2.3 Pewarnaan Endospora	43
4.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletakan (<i>Ruellia tuberosa L</i>)	45
4.4 Uji Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletakan (<i>Ruellia tuberosa L</i>)	48
4.4.1 Pembuatan Inokulum Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletakaan (<i>Ruellia tuberosa L</i>)	48
4.4.2 Produksi Metabolit Sekunder	48
4.4.3 Uji Aktivitas Antibakteri	49
4.5 Isolasi Bakteri Berdasarkan Prespektif Islam	54
BAB V PENUTUP.....	59
5.1 Kesimpulan	59
5.2 Saran	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman pletekan (<i>Ruellia tuberosa L</i>)	9
Gambar 2.2 Keberadaan mikroorganisme endofit pada jaringan tanaman	11
Gambar 2.3 Diagram alir identifikasi Gram positif	16
Gambar 2.4 Diagram alir identifikasi Gram negatif	17
Gambar 2.5 Bentuk mikroskopis koloni bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	20
Gambar 2.6 Bentuk mikroskopis koloni bakteri <i>Eschericia coli</i>	21
Gambar 4.1 Struktur dinding sel bakteri Gram positif.....	40
Gambar 4.2 Mekanisme kristal violet dengan iodin	41
Gambar 4.3 Pewarnaan Gram isolat bakteri endofit	42
Gambar 4.4 Kurva pertumbuhan isolat bakteri endofit	46
Gambar 4.4 Zona hambat uji antibakteri	51



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Ciri-ciri fase pertumbuhan bakteri	19
Tabel 4.1 Morfologi isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan	36
Tabel 4.2 Uji katalase.....	38
Tabel 4.3 Pewarnaan Gram	40
Tabel 4.4 Pewarnaan endospora.....	44
Tabel 4.4 Fase pertumbuhan Isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan (<i>Ruellia tuberosa L</i>).....	46
Tabel 4.5 Aktivitas antibakteri ekstrak kasar isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan penelitian.....	67
Lampiran 2 Diagram alir.....	68
Lampiran 3 Komposisi media	76
Lampiran 4 Hasil isolasi.....	78
Lampiran 5 Hasil uji katalase	79
Lampiran 6 Hasil pewarnaan endospora	81
Lampiran 7 Nilai OD kurva pertumbuhan	83
Lampiran 8 Hasil TPC bakteri uji	84
Lampiran 9 Hasil uji aktivitas antibakteri	86



ABSTRAK

Ramadhan, Z. A. 2017. Isolasi Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Pletekan (*Ruellia tuberosa L*) dan Uji Aktivitas Antibakteri. Laporan Penelitian. Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Anik Maunatin, S.T, M.P., Pembimbing II: Nur Aini, M.Si., Konsultan: Akyunul Jannah, S.Si, M.P.

Kata kunci: Isolasi, Bakteri endofit, Antibakteri

Mikroba endofit merupakan mikroba yang hidup didalam jaringan tanaman tanpa mengubah fungsi normal dari jaringannya, serta mampu memproduksi metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inang. Tanaman pletekan sebagai tanaman inang mampu memproduksi metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin dan saponin yang berpotensi sebagai antibakteri, sehingga tanaman pletekan dapat digunakan sebagai sumber bakteri endofit yang berpotensi dalam memproduksi senyawa antibakteri.

Isolasi bakteri endofit akar tanaman pletekan dilakukan dengan menggunakan metode tempel (*peace pant*) dan sebar (*spread plate*). Isolat hasil isolasi diidentifikasi meliputi morfologi koloni, pewarnaan Gram, pewarnaan endospora dan uji katalase. Uji antibakteri in vitro dilakukan dengan menggunakan metode uji Kirby-bauer dan diukur zona hambat sebagai nilai aktivitas antibakteri.

Hasil penelitian didapatkan 5 isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan yaitu isolat 1A, 1B, 1C, 1F dan 2C. Isolat hasil isolasi bakteri endofit akar tanaman pletekan merupakan golongan Gram positif, isolat 1C negatif endospora, isolat 1F negatif katalase dan endospora. Nilai aktivitas antibakteri terbesar terhadap bakteri *Eschericia coli* adalah isolat 2C sebesar 5,7 mm dan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* adalah isolat 1B sebesar 6,3 mm.

ABSTRACT

Ramadhan, Z. A. 2017. Isolation Endophytic Bacteria from Pletekan (*Ruellia tuberosa L*) Root and Antibacterial Test. Research Report. Chemistry Department of Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor I: Anik Maunatin, S.T, M.P., Advisor II: Nur Aini, M.Si., Consultant: Akyunul Jannah, S.Si, M.P.

Keyword: Isolation, Endophytic bacteria, Antibacterial

Endophytic bacteria is a microbe which lives inside the plant tissue without changing normal tissue function and capable to produce specific secondary metabolite which host plant produces. Pletekan plant as the host plant capacity to produce secondary metabolite such as flavonoids, tanin and saponins which are potential as antibacterial, therefore pletekan plant can be used as a source of potentially endophytic bacteria to produce antibacterial compound.

Isolation of endophytic bacteria from pletekan plant root was done by pease plant and spread plate method. The isolate of endophytic bacteria from pletekan plant root was identified by colony morphology, Gram stain, endospore stain and catalase test. In vitro antibacterial test was done by Kirby-Bauer method and measured inhibition zone as a number of antibacterial activity.

The result of this research was found 5 isolates endophytic bacteria from pletekan plant root those were, 1A, 1B and 2C were positive Gram, positive catalase and positive endospore. Isolate 1C was positive Gram, positive catalase and negative endospore, isolate 1F was positive Gram, negative catalase and endospore. The highest antibacterial activity against *Escherichia coli* was isolat 2C with inhibition diameter was 5.7 mm, against *Staphylococcus aureus* was isolate 1B with inhibition diameter was 6.3 mm.

الملخص الملخص

رمضان، ز. أ. 2018. انعزال جرثوم إندوفيت من جذر الحمى واختبار نشاط ضد الجرثوم. تقرير البحث. قسم الكيمياء بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة الأولى أنيك ماوناتين الماجستير والمشرفة الثانية نور عيني الماجستير والمستشارة أكيونو اللجنة الماجستير.

الكلمة الرئيسية: انعزال، جرثوم إندوفيت، ضد الجرثوم

جرثوم إندوفيت هو جرثوم ينمو في شبكة النباتات دون تغيير الوظيفة الطبيعية منها، يمكن له أن ينتج المستقلب الثانوي المتساوي بالظفر. كالنبات الظفري يمكن لجذر الحمى كالنبات الظفري أن ينتج المستقلب مثل فلافونويد وتانين وسابونين التي يمكنها أن تكون ضد الجرثوم، حتى يمكن استخدام جذر الحمى كمصدر جرثوم إندوفيت الذي ينتج ضد الجرثوم.

يقام انعزال جرثوم إندوفيت في جذر الحمى باستخدام طريقة الإلصاق والنشر. إن المنعزلات من ذلك الانعزال تشمل على تشكل مستوطنات وتلوين الغرام وتلوين نسيج المغذ بالنبات واختبار الحفاز. واختبار ضد الجرثوم في الأنابيب يقام باستخدام اختبار كيري باوير وإذا قيس في منطقة العقبات فهو من نتيجة نشاط ضد الجرثوم.

تدل نتائج هذا البحث على أن هناك 5 المنعزلات لجرثوم إندوفيت في جذر الحمى وهي تحتوي على منعزل A1 و B1 و C1 و F1 و C2. إنها من جزء الغرام الإيجابي، وأن منعزل C1 سلب لنسيج المغذ بالنبات و F1 سلب لنسيج المغذ بالنبات والحفاز. وأن نتيجة ضد الجرثوم أكبر لجرثوم اشيرشيا كولي هو منعزل C2 تبلغت 5,7 ميليمكرون وأما النتيجة لجرثوم مكورة عنقودية فهو منعزل B1 تبلغت 6,3 ميليمكرون.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah SWT telah memberikan suatu kenikmatan yang luar biasa kepada manusia berupa akal dan fikiran agar dipergunakan untuk berfikir. Tanaman, hewan dan mikroba telah diciptakan oleh Allah SWT dengan berbagai kelebihanannya. Segala sesuatu yang telah diciptakan oleh Allah SWT merupakan sesuatu yang tidak sia-sia, bahkan makhluk terkecil dan sesuatu yang paling kecil diciptakan dengan berbagai manfaatnya. Allah SWT berfirman dalam surat *Ali Imran* ayat 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَبْصَارِ ﴿١٩٠﴾
 الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ ۗ رَبَّنَا مَا
 خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا ۗ سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya: “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata) : “Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, Maka peliharalah Kami dari siksa neraka”*. (QS. *Ali Imran*: 190-191).

Kata *لأُولِي الْأَبْصَارِ* pada ayat diatas berdasarkan tafsir jalalain (2007), mengandung arti bagi orang yang mempergunakan pikiran mereka. Kriteria ulul albab dalam ayat diatas adalah *يَذْكُرُونَ اللَّهَ* mengingat Allah SWT dengan dzikir baik dengan lisan maupun hati dan *يَتَفَكَّرُونَ* memikirkan maksud kekuasaan penciptaan-

Nya, sehingga Manusia faham bahwa segala sesuatu yang diciptakan Allah SWT tidak ada yang sia-sia (Marwan, 2000). Manusia selain memiliki keharusan memikirkan ciptaan-Nya, juga menggali, mengkaji dan memanfaatkan ciptaan-Nya dengan sebaik mungkin. Allah SWT berfirman dalam surat An-nur ayat 45 :

وَاللَّهُ خَلَقَ كُلَّ دَابَّةٍ مِنْ مَّاءٍ ۚ فَمِنْهُمْ مَنْ يَمْشِي عَلَىٰ بَطْنِهِ وَمِنْهُمْ مَنْ يَمْشِي عَلَىٰ رِجْلَيْنِ ۚ وَمِنْهُمْ مَنْ يَمْشِي عَلَىٰ أَرْبَعٍ ۗ لَئِيَّا يَخْلُقَ اللَّهُ مَا يَشَاءُ ۗ إِنَّ اللَّهَ عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ ﴿٤٥﴾

“Dan Allah telah menciptakan semua jenis hewan dari air, maka sebagian ada yang berjalan di atas perutnya dan sebagian berjalan dengan dua kaki, sedang sebagian (yang lain) berjalan dengan empat kaki. Allah menciptakan apa yang Dia kehendaki. Sungguh, Allah Mahakuasa atas segala sesuatu” (An-nur : 45)

Ayat diatas menjelaskan mengenai penciptaan hewan, jasad renik (mikroba) dapat dipahami dari kata دَابَّةٍ. Menurut Asy-sya'rawi dalam tafsir ilmi kementerian agama 2015, mengatakan bahwa دَابَّةٍ adalah semua yang bergerak dimuka bumi termasuk jasad renik (mikroba) yang dapat dilihat dengan kaca pembesar dan atau mikroskop. Berdasarkan tafsir Departemen Agama RI (1994), bahwa ayat diatas memberikan anjuran agar supaya manusia memperhatikan binatang-binatang termasuk bakteri yang bermacam-macam jenis dan bentuknya.

Mikroba endofit telah diakui sebagai salah satu kelompok mikroba yang paling menjanjikan dalam hal keragaman dan potensi dalam bidang farmasi (Thashlimunisha, dkk., 2016). Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup didalam jaringan internal tanaman tanpa mengubah fungsi normal dari jaringannya (Kusari, dkk., 2014). Mikroba endofit dapat diisolasi dari berbagai bagian tanaman dari akar, batang, daun, bunga, buah dan biji (Lodewyckx, dkk., 2002). Mikroba endofit banyak terdapat pada bagian perakaran dan semakin

menurun jumlahnya pada batang dan daun (Lamb, dkk., 1996). Mikroba ini memiliki keunikan dalam beradaptasi, mereka hidup dilingkungan kimia yang spesifik dari tanaman inangnya. Beberapa diantara mikroba endofit memiliki kemampuan molekuler untuk mensintesis senyawa aktif spesifik yang dihasilkan oleh tanaman inangnya dan merupakan sumber produk alami yang belum diketahui (Brade, dkk., 2014). Sifat mikroba endofit yang tidak berdampak negatif terhadap tanaman inang, maka dapat dimungkinkan adanya hubungan simbiosis mutualisme antara mikroba endofit dengan tumbuhan inang.

Bakteri endofit telah banyak diisolasi dari berbagai tanaman herbal, salah satunya adalah tanaman pletekan yang telah terbukti secara ilmiah mampu menghasilkan senyawa aktif antibakteri. Berdasarkan hasil penelitian Kader, dkk., (2012) ekstrak etanol akar pletekan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus* dan jamur *Candida albicans* dengan masing-masing zona hambat sebesar 18 mm, 13 mm, dan 18 mm. Ekstrak etanol dan etil asetat akar pletekan dengan dosis 500 mg/ml memiliki nilai KBM 100% terhadap bakteri *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Aisyi, R., 2016). Selain itu ekstrak etanol daun pletekan mampu menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* dengan zona hambat sebesar 22,4 mm (Mutamimah, N., 2016). Uji fitokimia menunjukkan bahwa senyawa aktif dalam tanaman pletekan terdapat pada daun dan akar yang mengandung senyawa saponin. Menurut Arirudran, dkk (2011) dan Afzal, dkk (2015) saponin, flavonoid dan tanin memiliki aktifitas antibakteri dan antifungi serta dapat mencegah beberapa penyakit degenerasi oksidatif seperti kanker ataupun penyakit liver yang merupakan pemicu timbulnya diabetes mellitus. Berdasarkan beberapa penelitian

dapat dimungkinkan bahwa bakteri endofit tanaman pletekan mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya.

Isolasi bakteri endofit dari akar tanaman pletehakan pada penelitian ini dilakukan dengan dua metode yakni metode tempel (*peace plant*) dan sebar (*spread plate*). Metode tempel dilakukan dengan cara membelah organ akar dan menanamnya dalam media padat. Inokulasi dilakukan dengan posisi telungkup, bekas belahan ditempelkan dengan sedikit ditekan pada media padat (Kumar, dkk., 2016). Sedangkan metode sebar dilakukan dengan menghaluskan organ akar dengan mortal dan dilakukan pengenceran bertingkat 10^{-1} - 10^{-10} , pengenceran ke 10^{-3} - 10^{-10} diinokulasikan secara *pour plate* pada media padat NA dalam cawan petri (Sulistiyani, 2014). Metode yang sama telah banyak dilakukan dalam proses isolasi mikroba endofit seperti, Sukiman dan Nuriyanah (2016) berhasil mengisolasi bakteri endofit dari tanaman keladi tikus sebanyak 26 isolat dan 9 isolat sensitif terhadap bakteri *Bacillus subtilis*, isolat bakteri endofit KTD4 memiliki aktivitas tertinggi dengan zona hambat sebesar 3,029 mm dan 3 isolat sensitif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* isolat KTBt1 memiliki aktivitas tertinggi dengan zona hambat sebesar 2,042 mm. Purwanto, dkk. (2014) telah berhasil mengisolasi 14 isolat dari tanaman sirih hijau, isolat bakteri endofit BS1 memiliki aktivitas antibakteri tertinggi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan zona hambat sebesar 3 mm. 18 isolat berhasil diisolasi dari benalu sawo, 16 isolat benalu coklat dan 14 benalu kopi aktivitas tertinggi sebagai antibakteri terhadap *Eschericia coli* adalah isolat endofit benalu sawo Bbs4 dengan zona hambat sebesar 12,1 mm (Walpajri, dkk., 2014).

Bakteri endofit yang telah berhasil diisolasi kemudian diekstrak dengan menggunakan metode Sukiman dan Nuriyana, 2016. Supernatan hasil sentrifugasi yang dihasilkan digunakan sebagai ekstrak kasar metabolit sekunder bakteri endofit. Hasil ekstrak kasar metabolit sekunder setiap isolat bakteri endofit pada penelitian ini dilakukan uji aktivitasnya sebagai senyawa antibakteri. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode difusi cakram terhadap bakteri uji Gram positif (+) *Staphylococcus aureus* dan Gram negatif (-) *Eschericia coli* (Sukiman dan Nuriyanah, 2016). Tanaman pletakan telah diketahui memiliki aktivitas antibakteri (Arirudran, dkk., 2011), oleh karena itu bakteri endofit dari tanaman pletakan diharapkan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji.

Antibakteri adalah komponen senyawa kimia yang dapat menghambat dan bahkan mematikan mikroba (Utami, 2015). Penelitian eksploratif agen penghasil senyawa antibakteri menjadi suatu topik penting dalam berbagai disiplin ilmu beberapa tahun terakhir ini. Khususnya dalam bidang kesehatan, akibat munculnya beberapa mikroba patogen manusia yang resisten terhadap senyawa antibiotik.

Senyawa antibakteri dapat diperoleh secara sintetik maupun alami. Beberapa jenis antibakteri sintetik yang terkenal adalah golongan amoksilin, amoksilin asam klavulanat, ofloksasin dan pefloksasin. Golongan antibakteri sintetik tersebut merupakan resisten terhadap infeksi akibat bakteri *E. coli* (Noviana, 2004). Fenomena tersebut menjadikan banyaknya penelitian eksploratif senyawa antibakteri alami dari tanaman herbal dan juga mikroba. Telah banyak di ekstraksi dari tanaman herbal, seperti pada tanaman *Ruellia tuberosa L* yang mengandung senyawa aktif saponin, flavanoid dan tanin dan memiliki kemampuan sebagai antibakteri terhadap bakteri Gram positif (+) seperti

Staphylococcus aureus, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* dan *Bacillus subtilis* dan bakteri Gram negatif (-) seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* dan *Shigella sonnei* (Kader, dkk., 2012). Selain itu senyawa antibakteri alami dapat diperoleh dari mikroba endofit karena kemampuannya untuk memproduksi metabolit sekunder yang spesifik dengan tanaman inangnya.

Berdasarkan pemaparan diatas maka perlu diadakan penelitian isolasi bakteri endofit dari akar tanaman pletakan sebagai agen penghasil metabolit sekunder senyawa antibakteri.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, maka pada penelitian dirumuskan masalah yang perlu diteliti, yaitu:

1. Jenis bakteri endofit apa yang dapat diisolasi dari akar tanaman pletakan (*Ruellia tuberosa L.*)?
2. Bagaimana aktivitas antibakteri bakteri endofit hasil isolasi dari tanaman pletakan (*Ruellia tuberosa L.*)

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah diatas, penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui jenis bakteri endofit hasil isolasi dari akar tanaman Pletakan (*Ruellia tuberosa L.*).
2. Mengetahui potensi bakteri endofit hasil isolasi dari akar tanaman Pletakan (*Ruellia tuberosa L.*) sebagai penghasil senyawa antibakteri.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai:

1. Informasi awal mengenai keberadaan bakteri endofit dari akar tanaman Pletekan (*Ruellia tuberosa L.*).
2. Informasi awal dan pengetahuan mengenai potensi bakteri endofit hasil isolasi dari akar tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa L.*) sebagai penghasil senyawa antibakteri.
3. Sumber hayati antibakteri yang dapat dikembangkan lebih lanjut dalam jumlah yang besar sebagai sumber obat herbal.

1.5 Batasan Masalah

Untuk menjadikan penelitian ini terarah, maka pada penelitian ini terdapat beberapa batasan masalah sebagai berikut:

1. Bakteri endofit yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bakteri endofit hasil isolasi dari akar tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa L.*) dari Desa Kesambi, Lamongan, Jawa timur.
2. Bagian tanaman yang diisolasi keberadaan bakteri endofitnya adalah akar tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa L.*).
3. Identifikasi yang dilakukan adalah uji katalase, pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora.
4. Uji aktifitas antibakteri digunakan dengan metode difusi cakram.
5. Parameter yang diamati pada uji aktifitas antibakteri adalah besarnya diameter zona hambat.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.)

Tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) sering dikenal dengan nama pletekan, pletikan, ceplikan, pletesan oleh masyarakat luas. Pletekan merupakan herba tegak yang sering dijumpai tumbuh liar diberbagai tempat yang tidak terurus. Tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) berasal dari Hindia Barat dan menyebar diberbagai Negara, karena pletekan dapat bertahan hidup diberbagai kondisi lingkungan. Batang tumbuhan ini berdiri tegak dengan pangkal sedikit berbaring, bersegi, massif, serta hijau. Daun berbentuk solet, ujung membulat, pangkal runcing, tepi bergigi yang memiliki panjang mencapai 6-18 cm, lebar 3-9 cm yang tersusun secara bersilang berhadapan dan tulang daun menyirip. Bunga majemuknya berwarna ungu di ketiak daun dengan dasar mahkota membentuk tabung. Buah matang, dalam polong dengan 7-8 biji masing-masing, meledak terbuka dengan keras, ketika mereka basah dan biji hitam melompatinya pergi. (Shahwar, dkk. 2011).

Tanaman pletekan secara taksonomi mempunyai klasifikasi ilmiah sebagai berikut (Ditjen POM, 2009):

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Super Divisi	: Spermatophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida / Dicotyledoneae (berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas	: Asteridae
Ordo	: Scrophulariales
Famili	: Acanthaceae
Genus	: <i>Ruellia</i>
Spesies	: <i>Ruellia tuberosa</i> L.



Gambar 2.1 Tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) (Amelia, 2015)

2.2 Kandungan Kimia Tanaman Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.)

Hasil uji fitokimia yang telah dilakukan pada tanaman pletekan menunjukkan bahwa bagian daun dan akar tumbuhan pletekan mengandung saponin. Saponin merupakan kelompok senyawa dalam bentuk glikosida terpenoid atau steroid. Disamping itu, daunnya mengandung polifenol dan akarnya mengandung flavonoida. Pletekan dapat dikembangkan sebagai antioksidan yang efektif untuk melawan beberapa penyakit degenerasi oksidatif seperti kanker ataupun penyakit liver yang merupakan pemicu timbulnya diabetes mellitus (Arirudran, dkk., 2011). Pada penelitian lain disebutkan bahwa dalam ekstrak n-Heksan tanaman pletekan terkandung senyawa steroid dan triterpenoid. Pada ekstrak kloroform nya terkandung senyawa steroid, triterpenoid dan fenol. Sedangkan pada ekstrak etil asetat, alkohol dan air terkandung senyawa steroid, triterpenoid, fenol, flavonoid, tanin dan glukosa (Arirudran, dkk., 2011).

2.3 Khasiat Tanaman Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.)

Tanaman pletekan berkhasiat sebagai obat alami untuk membantu mengurangi peradangan, panas, demam, nyeri, asma, impotensi pria, dan diabetes. Pletekan juga dapat membantu mengurangi gas dalam sistem pencernaan, dan meredakan sakit perut yang terkait. Akarnya digunakan untuk mengobati sakit perut, sakit gigi, pilek, *heartburn*, hipertensi, infeksi saluran kemih dan diabetes tipe 1 maupun tipe 2 (Bram, 2014). Secara tradisional, bubuk akar daun pletekan yang telah dijemur sampai benar-benar kering dibawah terik matahari dapat digunakan untuk menyembuhkan luka lambung dan usus dua belas jari. Akarnya juga dapat dibuat untuk mengobati batu ginjal dan infeksi saluran kemih (Bram, 2014).

Manfaat pletekan ini dapat dijadikan acuan dalam pengembangan alternatif obat baru, sebagaimana sabda Rasulullah SAW yang diriwayatkan oleh Abu Dawud dalam *Sunan-nya* (Kitab *Ath-Thibb*):

أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ الدَّاءَ وَالدَّوَاءَ، وَجَعَلَ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءً فَتَدَاوَوْا وَلَا تَدَاوَوْا بِحَرَامٍ.

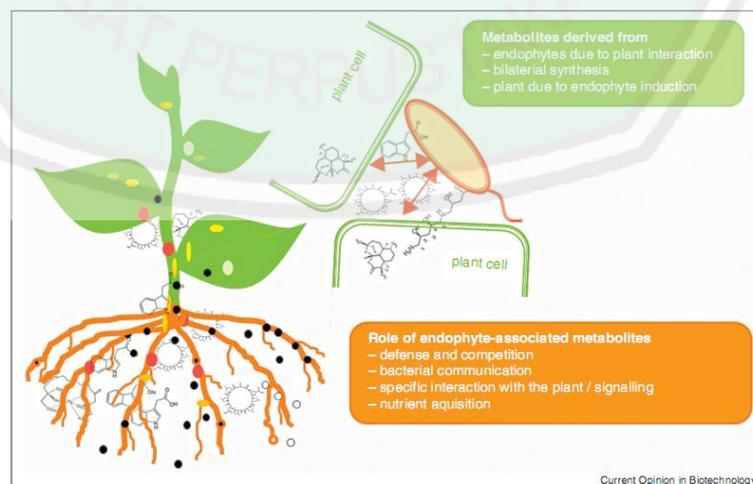
Artinya: “Sesungguhnya Allah menurunkan penyakit beserta obatnya, dan menciptakan obat untuk setiap penyakit, maka berobatlah kalian namun jangan berobat dengan yang haram” (HR. Abu Dawud) (An-Najjar, 2006).

Menurut Qardhawi (1998), menerangkan bahwa Ibnu Qayyim menulis dalam *Zadul-Ma’ad* bahwa sabda Rasul “لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ”, merupakan penguat bagi setiap orang dan merupakan dorongan untuk terus mencari obat untuk mencarinya dan menelitinya. Penjelasan hadits tersebut memberikan pesan kepada manusia untuk meyakini bahwa Allah menurunkan penyakit begitu pula dengan obatnya,

sehingga sebagai umat islam, disamping terus beriman kepada Allah SWT juga harus berusaha mencari obat dari penyakitnya bahkan melakukan penelitian terhadap sesuatu yang berpotensi sebagai obat, sebagaimana manfaat daun pletekan yang dapat dijadikan sebagai obat. Diantara manfaat lain dari daun pletekan adalah ekstrak metanol daun pletekan mampu menghambat pertumbuhan jamur *Penicillium* sp, *Mucor* sp, *Tricoderma* sp dan *Aspergillus* sp (Vasantharaj, dkk., 2013).

2.4 Bakteri Endofit

Bakteri endofit merupakan mikro-organisme yang hidup di jaringan internal tanaman. Bakteri endofit tidak menimbulkan penyakit bagi tanaman inangnya, namun bakteri endofit memberikan keuntungan bagi tanaman inang yakni sebagai pengatur pertumbuhan, ketahanan terhadap penyakit dan membantu melakukan fitoremediasi senyawa yang berbahaya bagi tanaman (Aswathy, dkk., 2012).



Gambar 2.2 Keberadaan mikroorganisme endofit pada jaringan tanaman (Brader, dkk., 2014)

Bakteri endofit dapat membentuk koloni dibagian buah, bunga, daun, batang dan akar tanaman. Populasi bakteri endofit sangatlah beragam, hal ini tergantung dari jenis senyawa yang diproduksi oleh tanaman inang dan tempat tumbuh tanama inang (Gouda, dkk., 2016).

Beberapa hipotesis yang dapat digunakan sebagai strategi pemilihan tanaman yang dapat dipertimbangkan untuk mendapatkan mikroba endofit yang memiliki bioaktivitas adalah sebagai berikut (Strobel dan Daisy, 2003):

- a. Tanaman tumbuh dengan keadaan lingkungan yang unik, terutama dengan kondisi biologi yang tidak biasa.
- b. Tanaman yang memiliki sejarah ethnobotanical yang berhubungan dengan penggunaan atau aplikasi tertentu. Biasanya berdasarkan literatur atau kontak langsung dengan masyarakat lokal.
- c. Tanaman endemik yang memiliki umur tanaman yang tidak biasa.
- d. Tanaman yang tumbuh di daerah dengan keragaman hayati yang besar.

Beberapa penelitian dalam bidang kesehatan menunjukkan bahwa bakteri endofit mampu menghasilkan berbagai jenis senyawa bioaktif seperti antikanker, antioksidan, antibiotik, dan anti inflamasi (Strobel dan Daisy 2003; Ryan, dkk., 2007; Pimentel, dkk., 2011). Aswathy (2012) telah melakukan isolasi bakteri endofit dari akar (rimpang) tanaman kunyit dan didapatkan kekerabatan bakteri endofit berdasarkan identifikasi 16s RNA terbesar pada akar kunyit adalah golongan bakteri *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sp.*, *Bacillus pumilus*, *Pseu-domonas putida* dan *Clavibacter michiga-nensis*.

2.4.1 Interaksi Bakteri Endofit Dengan Tanaman Inang

Tanaman dan mikroba tanah selalu berkompetisi dalam mendapatkan nutrisi untuk pertumbuhannya. Beberapa mikroba tanah dapat bersifat patogen terhadap tanaman dan beberapa diantaranya merupakan mikroba yang mampu berinteraksi secara simbiosis mutualisme dengan tanaman. Akar tanaman merupakan penyedia nutrisi dan energi bagi mikroba tanah (Ma, y., dkk, 2016). Bakteri endofit merupakan bakteri rhizosperic yang menginfeksi tanaman melalui akar, dimana infeksi ini dapat terjadi karena adanya percabangan akar yang patah dan luka selama perkecambahan (Bacon, C. W., dan Hinton, D, M., 2007). Tanaman melakukan seleksi bakteri rhizosperic yang berhasil menginfeksi jaringannya, dengan mengeluarkan metabolisme sekunder sebagai senyawa pertahanan terhadap infeksi patogen. Bakteri rhizosperic sebagian akan mati dan sebagian yang lain akan tetap hidup di dalam jaringan tanaman (Bulgarelli, dkk., 2013). Bakteri rhizosperic yang masih hidup akan melakukan gerakan kemotaksis menuju jaringan internal dan pembuluh xylem tanaman sebagai bakteri endofit. Populasi bakteri endofit di dalam jaringan internal dan pembuluh xylem tanaman sebesar 101-107 sel/gr berat tanaman (Gnanamanickam, 2007).

Interaksi mikroba endofit dengan tanaman inang adalah simbiosis mutualisme. Tanaman sebagai penyedia nutrisi bagi mikroba endofit, sedangkan mikroba endofit membantu tanaman dalam proteksi diri dari bahaya eksternal dan internal. Beberapa mikroba endofit banyak diteliti sebagai agen fitoremediasi dan membantu pertumbuhan tanaman (Brader, 2014). Mikroba endofit mampu memproduksi metabolit sekunder spesifik seperti tanaman inang. Kemampuan mikroba endofit tersebut disebabkan adanya proses transformasi genetik pada

mikroba endofit (Afzal, dkk., 2014). Transformasi genetik ini terjadi karena penyesuaian diri mikroba endofit terhadap lingkungan baru. Tanaman yang secara kontinyu melepaskan metabolit sekundernya, menyebabkan mikroba endofit mengalami transformasi genetik dengan cara mengambil urutan DNA eksternal kedalam sel mikroba endofit. Transformasi genetik inilah yang menyebabkan mikroba endofit mampu memproduksi metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya (Segura, dkk., 2009).

2.5 Isolasi Mikroba

Waluyo (2008) menjelaskan bahwa isolasi mikroba merupakan suatu pemisahan mikroba satu dengan yang lain yang berasal dari campuran berbagai jenis mikroba. Cara mengisolasi mikroba dilakukan dengan cara menumbuhkan dalam medium padat, sel-sel mikroba akan membentuk suatu koloni yang tetap pada tempatnya. Berbagai sel mikroba yang tertangkap pada medium padat pada beberapa tempat yang terpisah, maka sel atau kumpulan sel mikroba yang hidup akan berkembang menjadi satu jenis koloni yang terpisah. Tahapan isolasi meliputi mendapatkan, memurnikan, identifikais, dan pengujian produksi (Hidayat dkk., 2006).

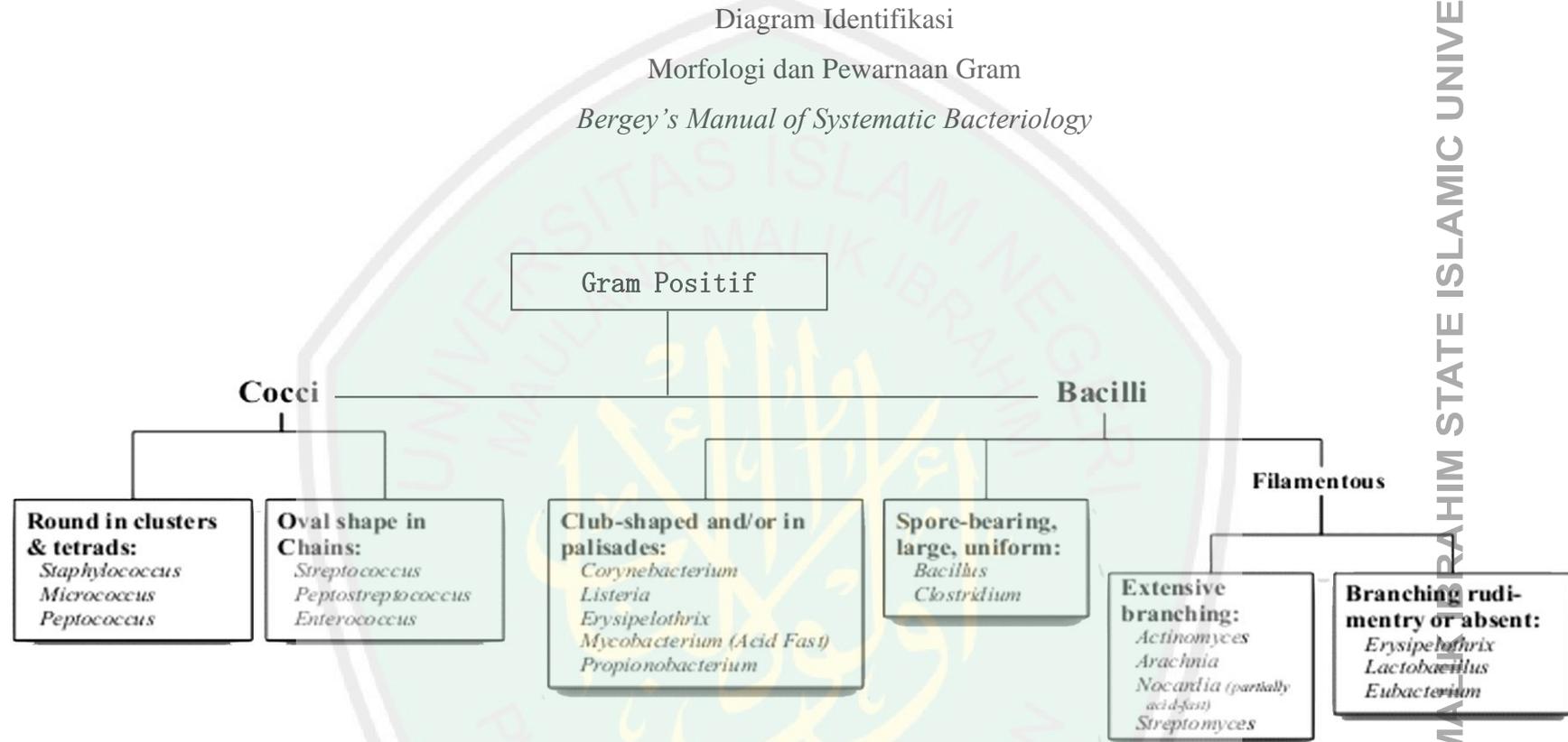
Terdapat beberapa macam teknik mengisolasi mikroba. Isolasi harus memperhatikan beberapa hal penting yakni: sifat spesies mikroba yang akan diisolasi, asal mikroba, medium untuk pertumbuhan yang sesuai, cara menanam mikroba, cara inkubasi mikroba, cara menguji bahwa mikroba yang diisolasi telah berupa biakan murni dan sesuai dengan yang ingin diisolasi dan cara memelihara agar mikroba yang telah diisolasi tetap merupakan biakan murni (Waluyo, 2008).

2.6 Pewarnaan Gram

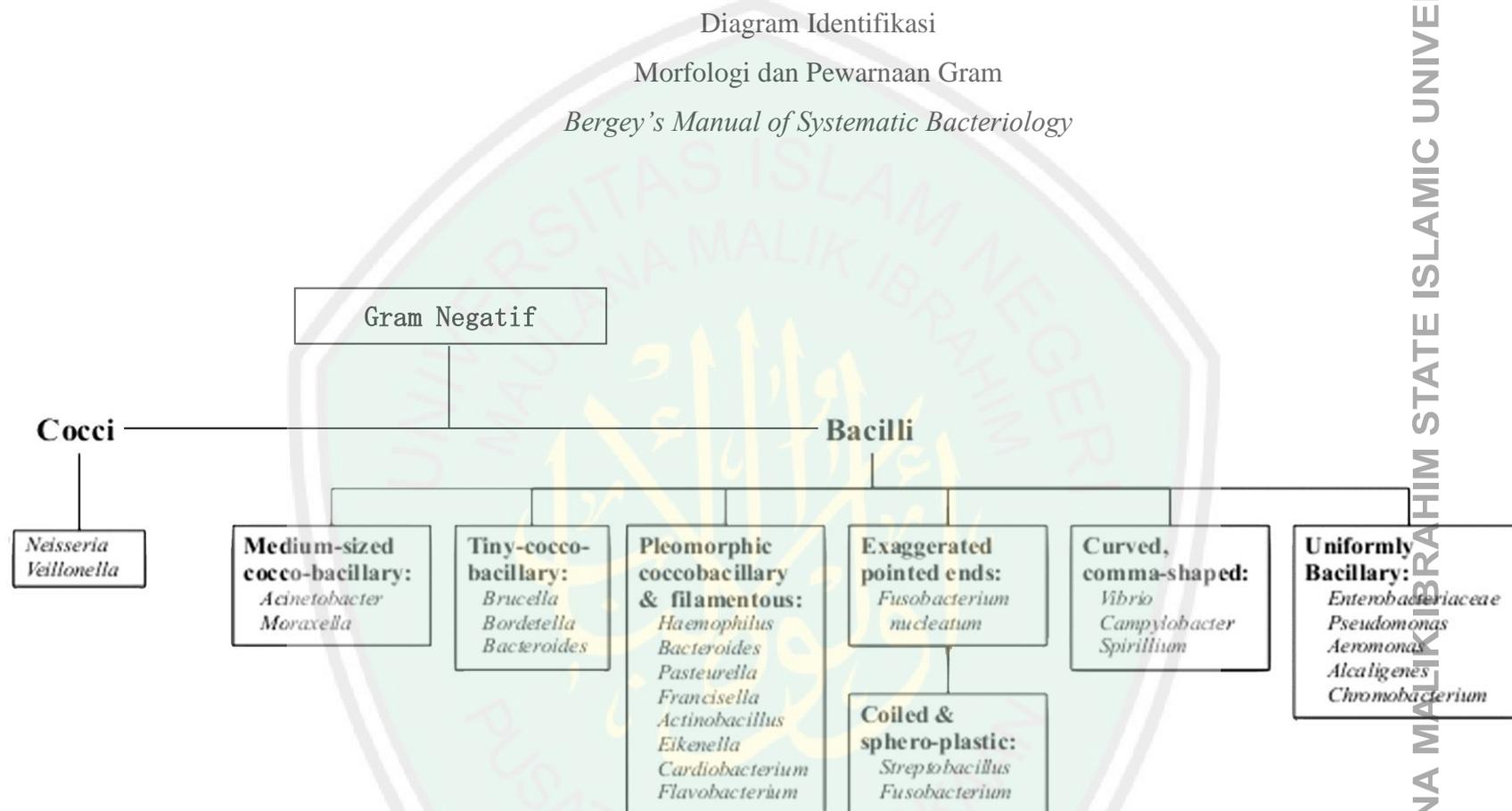
Mikroba yang terdapat di alam memiliki beberapa perbedaan dan kesamaan pada morfologi, struktur dan sifat-sifat satu dengan yang lainnya. Mikroba dalam hal ini adalah bakteri secara umum hampir tidak berwarna dan kontras dengan air, ketika tersuspensi didalamnya. Hal tersebut perlu dilakukan identifikasi sel bakteri, salah satu metode identifikasi fisiologis adalah dengan cara pengecatan. Jawetz (2008) menyatakan bahwa metode pengecatan merupakan salah satu cara paling utama dalam penelitian mikrobiologi.

Pewarnaan Gram juga dapat digunakan untuk identifikasi morfologi seperti karakterisasi koloni bakteri hasil isolasi yaitu berdasarkan (Prescott, 2002):

1. Bentuk koloni (dilihat dari atas) : berupa titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa akar, serupa kumpanan.
2. Permukaan koloni (dilihat dari samping) : rata, timbul-datar, melengkung, membukit, serupa kawah.
3. Tepi koloni (dilihat dari atas) : utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, keriting.
4. Warna koloni : keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening.



Gambar 2.3 Diagram alir identifikasi Gram positif (Veterinary Bacteriology and Mycology VPM 201. 2011)



Gambar 2.4 Diagram alir identifikasi Gram negatif (Veterinary Bacteriology and Mycology VPM 201. 2011)

Prinsip dasar dari metode pewarnaan atau pengecatan Gram berhubungan dengan ketebalan dinding sel dari bakteri serta komposisi lapisan peptidoglikan pada dinding sel bakteri (Strohl, dkk., 2001). Pengujian pewarnaan Gram sendiri menunjukkan bakteri Gram negatif akan tampak berwarna merah dibawah mikroskop sedangkan bakteri Gram positif berwarna ungu.

2.7 Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora memiliki prinsip yang sama seperti pewarnaan Gram. Prinsip dasarnya adalah adanya ikatan ion antara komponen selular dari bakteri dengan senyawa aktif dari pewarna yang disebut kromogen. Ikatan ion ini dapat terjadi karena adanya muatan listrik baik pada komponen selular maupun pewarna (Umsl, 2008). Pengujian pewarnaan endospore akan menunjukkan bahwa bakteri merupakan jenis bakteri yang mampu menghasilkan endospora. Pengujian pewarnaan endospora akan menunjukkan uji positif endospora dengan menunjukkan warna hijau dan warna merah pada sel vegetatif (Lay, 1994).

Salah satu ciri endospora bakteri adalah susunan kimiawinya. Semua endospora bakteri mengandung sejumlah besar asam dipikolinat yang merupakan substansi yang tidak terdeteksi pada sel-sel vegetative. Senyawa asam dipikolinat merupakan 5-10% berat kering endospora (Pelczar, 2008). Endospora terbentuk ketika pertumbuhan bakteri mendekati fase stationer (Volk, dkk., 1988).

2.8 Uji Katalase

Uji katalase merupakan salah satu uji biokimia untuk menentukan proses biokimia atau metabolisme sel. Uji katalase terhadap suatu bakteri bertujuan untuk

mengetahui potensi suatu bakteri dalam menghasilkan enzim katalase. Enzim katalase sendiri memiliki kemampuan untuk mereduksi senyawa efek toksik dari H_2O_2 . Terbentuknya gelembung gas pada sediaan, menunjukkan uji positif mengandung enzim katalase (Lay, 1994)

2.9 Kurva Pertumbuhan

Istilah pertumbuhan umum digunakan untuk bakteri dan mikroba lain dan biasanya mengacu pada perubahan di dalam hasil panen sel (pertambahan total massa sel) dan bukan perubahan individu organisme. Pertumbuhan menyatakan pertambahan jumlah dan atau massa melebihi yang ada di dalam inokulum asalnya (Pelczar, dkk., 2008). Kurva pertumbuhan menyajikan empat fase pertumbuhan mikroba. Empat fase dan ciri pertumbuhan bakteri pada setiap fase ditunjukkan pada tabel 2.1 berikut (Tortora, dkk., 2001):

Tabel 2.1 Ciri-ciri fase pertumbuhan bakteri

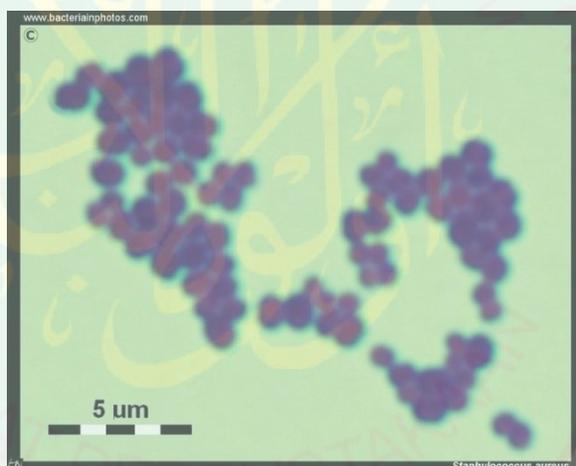
Fase Pertumbuhan	Ciri
Lag (adaptasi)	<ul style="list-style-type: none"> - Jumlah perubahan sel sangat sedikit - Sel tidak aktif karena populasi mikroba sedang mengalami aktivitas metabolisme tertentu yang meliputi DNA dan sintesis enzim, jadi tidak ada perubahan jumlah tapi perubahan massa.
Log (eksponensial)	<ul style="list-style-type: none"> - Sel mulai membelah dan masuk kedalam periode pertumbuhan - Reproduksi sel paling aktif dan waktu generasinya konstan
Statif (stasioner)	<ul style="list-style-type: none"> - Laju pertumbuhan lambat sehingga jumlah bakteri yang hidup dan mati seimbang dan populasinya stabil
Kematian	<ul style="list-style-type: none"> - Laju kematian sel lebih cepat dari pada terbentuknya sel baru

2.10 Bakteri Uji

2.10.1 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri *S. aureus* bersifat gram positif, tidak dapat bergerak, tidak dapat membentuk spora bersifat fakultatif anaerob serta tidak membentuk kapsul (Suryani et al, 2007). Berikut adalah klasifikasi bakteri *S. aureus* (Jauhari, 2010):

Kingdom	: Bakteria
Phylum	: Firmicutes
Kelas	: Bacili
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>



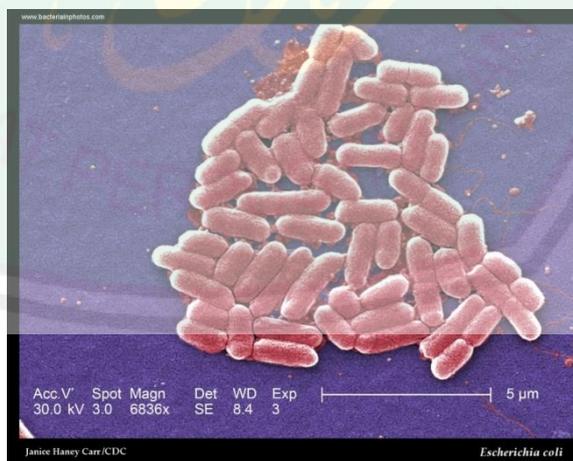
Gambar 2.5 Bentuk mikroskopis koloni bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus aureus* dapat menyerang seluruh tubuh. Bentuk klinisnya tergantung dari bagian tubuh yang terkena infeksi. Seperti, diare, keracunan makanan, ensefalitis, emdokarditis dan septisema (Tim Mikrobiologi, 2003).

2.10.2 Bakteri *Escherichia coli*

Bakteri *E. coli* merupakan bakteri gram negative ada yang dapat bergerak ada yang tidak. Bakteri gram negative memiliki dinding sel yang tipis sekitar 10-15 nm dan berlapis tiga, kandungan lipid pada dinding sel bakteri gram negatif lebih tinggi sekitar 1-12% dibanding bakteri gram positif. Peptidoglikan berada di dalam lapisan kaku sebelah dalam (Pelczar, 1986). Bakteri *E. coli* memiliki ukuran sel dengan panjang 2-6 μm dan lebar 1,1-1,5 μm , tidak ditemukan spora, bersifat fakultatif aerobik. Memiliki kapsula terbuat dari asam – asam polisakarida (Hidayati, 2010). Berikut adalah klasifikasi bakteri *E. coli* yakni (Bergey's, 2005):

Kingdom	: Bakteria
Phylum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>



Gambar 2.6 Bentuk mikroskopis koloni bakteri *Escherichia coli*

Beberapa jenis penyakit yang disebabkan oleh bakteri *E. coli* antara lain infeksi saluran kemih, diare, sepsis dan meningitis (Jewetz et al, 1995).

2.11 Antibakteri

Antibakteri merupakan suatu zat hasil metabolit sekunder dari suatu mikroorganisme atau tanaman yang dapat menghambat pertumbuhan dan reproduksi bakteri. Senyawa antibakteri dari mikroorganisme dihasilkan dalam jumlah yang sedikit dengan kemampuan menghambat mikroorganisme lainnya (Hayati, 2010). Bahan antibakteri merupakan bahan penghambat pertumbuhan kelompok mikroorganisme khusus. Komposisi antibakteri merupakan komposisi kimia yang berkemampuan dalam menghambat pertumbuhan atau bahkan mematikan mikroorganisme khusus (Utami, 2005)

Salah satu tujuan penggunaan antibiotic adalah untuk mengendalikan bakteri patogen penyebab penyakit. Tujuan dari pengendalian adalah mencegah adanya infeksi, membunuh dan menghilangkan bakteri pada sel inang yang terinfeksi, mencegah pembusukan dan kerusakan bahan akibat aktivitas bakteri (Pleczar, 1988).

Geo, dkk., (2007), menggolongkan aktivitas senyawa antibakteri berdasarkan sifat toksisitas selektif sebagai berikut:

- a. Bakterisidal, merupakan antibakteri dengan kemampuan membunuh bakteri dengan menyerang dinding bakteri sehingga dapat terjadi lisis. sehingga bakteri tidak akan dapat bereproduksi kembali meskipun penggunaan antibakteri dihentikan.
- b. Bakteriostatik, merupakan antibakteri dengan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri sehingga jumlah sel bakteri yang masih hidup akan tetap tidak ada pertambahan jumlah koloni. Dalam kondisi ini bakteri akan kembali beraktivitas ketika penggunaan antibakteri dihentikan.

2.12 Metode Uji Antibakteri

Uji antibakteri adalah langkah terpenting untuk menentukan suatu senyawa mampu digunakan sebagai suatu obat atau antibakteri. Metode uji antibakteri secara invitro dapat dilakukan untuk mengetahui aktivitas suatu senyawa memiliki potensi menghambat pertumbuhan dan atau membunuh suatu bakteri patogen. Pengujian aktivitas antibakteri secara in vitro dapat dilakukan melalui dua cara yakni (Tortora, dkk., 2001):

1. Metode Difusi Cakram

Prinsip metode difusi cakram adalah dengan menempatkan kertas cakram yang mengandung senyawa antibakteri pada media padat yang telah dicampur dengan bakteri uji. Metode ini akan menunjukkan adanya zona bening disekitar kertas cakram. Zona bening ini akan tampak disekitar kertas cakram yang menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri uji. Bakteri yang sensitif terhadap senyawa antibakteri ditandai dengan adanya zona hambat disekitar cakram dan sebaliknya.

2. Metode Dilusi

Prinsip metode dilusi adalah penggunaan satu seri tabung reaksi dengan medium cair dan sejumlah bakteri uji kemudian masing-masing seri tabung reaksi berisi bakteri uji ditambahkan senyawa antibakteri. Metode dilusi digunakan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimum) dengan ditunjukkan adanya perbedaan kekeruhan. Hasil positif ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri yang merupakan konsentrasi hambat minimum). Biakan dari tabung yang jernih ditumbuhkan pada media agar padat dan diamati apakah terdapat koloni

bakteri yang tumbuh. Konsentrasi terendah senyawa antibakteri pada biakan medium agar padat ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri yang disebut dengan konsentrasi bunuh minimum senyawa antibakteri terhadap bakteri uji.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium biokimia riset, jurusan kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim Malang. Dimulai 30 Maret – 30 November 2017.

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari dua tahap. Tahap pertama merupakan penelitian bersifat deskriptif kualitatif untuk melakukan isolasi bakteri endofit dari akar tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa* L.). Tahap kedua merupakan penelitian deskriptif kuantitatif untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari isolat bakteri endofit yang dihasilkan.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, aluminium foil, pipet ukur, pipet tetes, botol media, botol spray, bunsen, cawan petri, *cover glass*, Erlenmeyer, gelas ukur, gelas obyek, *incubator*, jarum ose, *hotplate*, *laminar air flow*, pengaduk kaca, pinset, pisau, plastik wrap, *shaker incubator*, timbangan analitik, tabung reaksi, mikroskop dan spektrofotometer uv-vis.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa* L.), media Nutrien Agar (NA), media NB (NB), etanol 70 %, larutan NaOCl 5,23%, aquabides, larutan kristal ungu, larutan iodin, larutan safranin, larutan *malachite green*, larutan anti fungi, kertas saring whatman, kapas, spirtus dan tisu.

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan – tahapan dalam penelitian ini meliputi:

1. Sterilisasi alat dan bahan
2. Pembuatan media
3. Isolasi bakteri endofit dari akar tanaman plethekan
4. Pemurnian bakteri endofit
5. Identifikasi isolat bakteri endofit
6. Pembuatan inokulum
7. Pembuatan kurva pertumbuhan
8. Produksi metabolit sekunder bakteri endofit
9. Uji aktivitas antibakteri

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan dibungkus dengan aluminuim foil kemudian dimasukkan kedalam autoklaf pada suhu 121⁰C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 20 menit.

3.5.2 Pembuatan Media (Safitri, 2010)

3.5.2.1 Pembuatan Media NA (*Nutrien Agar*)

NA (*Nutrient Agar*) sebanyak 20 gram dilarutkan dalam satu liter aquades hangat, kemudian dipanaskan dan distirer menggunakan *hotplate* sampai mendidih. Dimasukkan kedalam tabung reaksi untuk membuat media agar miring dan ditutup dengan kapas. Disterilisasi di dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C, tekanan 15 psi. Ditunggu sampai dingin sekitar suhu 40-45⁰C, diletakkan ke dalam cawan petri untuk media inokulasi. Medium dalam kondisi steril akan terhindar dari kontaminasi dan akan tahan lama apabila disimpan pada suhu 4⁰C.

3.5.2.2 Pembuatan Media NB (*Nutrien Broth*)

NB (*Nutrient Broth*) sebanyak 13 gram dilarutkan dalam 1 liter aquades hangat menggunakan gelas kimia, kemudian dipanaskan dan distirer menggunakan *hotplate* sampai mendidih. Dituang ke dalam erlenmeyer yang ditutup dengan kapas steril. Media tersebut disterilkan didalam autoklaf pada suhu 121⁰C, tekanan 15 psi. Ditunggu sampai dingin sekitar suhu 40-45⁰C. Media dalam kondisi steril akan terhindar dari kontaminasi dan akan tahan lama apabila disimpan pada suhu 4⁰C.

3.5.3 Sterilisasi permukaan Akar Tanaman Pletakan (Kumar, dkk., 2016)

Sampel akar tanaman pletakan baru (*fresh*) dibersihkan dari tanah, dengan cara dicuci menggunakan air kran mengalir selama 5-10 menit. Akar tanaman pletakan dipotong dengan panjang 1 cm dan direndam dalam 10 mL larutan etanol

70% selama 3 menit, 10 mL larutan NaOCl 5,23 % selama 3 menit dan 10 mL larutan etanol 70% selama 30 detik. Kemudian dibilas selama 3 kali dengan aquades selama 2 menit, 1 menit dan 30 detik. Dikeringkan dengan kertas tisu steril.

Pengujian efisiensi sterilisasi permukaan dilakukan dengan menginokulasikan aquades hasil sterilisasi permukaan (bilasan) terakhir ke dalam media nutrient agar (NA). Jika menunjukkan adanya pertumbuhan mikroba di dalam media, maka sampel yang telah disterilisasi permukaan tidak dapat digunakan. Dan harus diulang proses sterilisasi permukaan kembali sampai tidak ada pertumbuhan bakteri pada aquades hasil sterilisasi (bilasan) terakhir.

3.5.4 Isolasi Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletekan Metode Tempel (*Peace Plant*) (Kumar, 2016)

Isolasi bakteri endofit dilakukan dengan membelah sampel dengan pisau steril. Ditanam ke dalam media nutrient agar dengan cara menempelkan bagian yang dibelah dengan sedikit ditekan. Sampel kemudian diinkubasi selama 2-5 hari pada suhu 30°C. Koloni bakteri yang tumbuh diisolasi dan dipurifikasi.

3.5.5 Isolasi Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletekan Metode Sebar (*Spread Plate*) (Sulistiyani, 2014)

Isolasi dilakukan dengan menghaluskan sampel dan aquades steril sebanyak 2 ml menggunakan mortal alu steril. Larutan sampel di ambil 1 ml ke dalam 9 ml larutan NaCl 0,85% steril dan divortex (pengenceran 10^{-1}). Dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-10} dengan mengambil 1 ml dari pengenceran

sebelumnya. Setiap pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-10} diambil 1 ml dan ditanaman dalam media padat NA secara *pour plate*. Diinkubasi pada suhu ruang selama 2-3 hari.

3.5.6 Pemurnian Isolat Bakteri Endofit (Nursulistyarini dan Ainy, 2013)

Pemurnian isolat bakteri endofit dilakukan dengan metode kuadran. Digoreskan koloni bakteri yang telah tumbuh, kedalam media nutrient agar (NA). Pemurnian dilakukan beberapa kali sampai diperoleh koloni tunggal dominan. Koloni yang telah murni ditanam dalam media miring nutrient agar (NA) setiap isolate digunakan sebagai kultur kerja dan kultur stok dan disimpan pada suhu 4°C .

3.5.7 Identifikasi Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletakan Metode Tempel (*Peace Plant*)

Isolat bakteri endofit akar pletakan yang telah berhasil diisolasi kemudian diidentifikasi morfologi secara makroskopis meliputi bentuk koloni, permukaan koloni, tepi koloni dan warna koloni. Selanjutnya dilakukan identifikasi meliputi pewarnaan Gram, uji katalase dan uji pewarnaan endospora.

3.5.7.1 Identifikasi Morfologi

Pengamatan morfologi dilakukan tidak menggunakan alat bantu mikroskop. Pada identifikasi morfologi dilakukukan dengan pengamatan secara langsung bentuk, warna, permukaan dan tepi koloni. Isolat bakteri endofit diinokulasikan satu ose pada media NA padat dalam cawan petri dan diinkubasi

selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Setelah isolat tumbuh pada media, pengamatan dapat dilakukan dengan membandingkannya berdasarkan panduan identifikasi makroskopis *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

3.5.7.2 Uji Katalase (Pratiwi, 2008)

Uji katalase dilakukan untuk menentukan apakah bakteri bersifat aerobik atau anaerobik. Uji katalase jika terbentuk gelembung maka bakteri positif bersifat aerobik dan sebaliknya. Uji katalase dilakukan dengan cara biakan murni isolat bakteri endofit yang berumur 24 jam diambil satu ose secara aseptis dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan dengan aquades steril sebanyak satu tetes. Suspensi ditetesi dengan larutan H₂O₂ 3 %, selanjutnya diamati pembentukan gelembung udara (positif) yang terjadi pada koloni dan sekitarnya.

3.5.7.3 Pewarnaan Gram (Hadioetomo, 1985)

Isolat bakteri endofit diambil satu jarum ose secara aseptis dan disuspensikan dengan aquades di atas gelas objek. Preparat difiksasi diatas api Bunsen sampai kering. Preparat ditetesi dengan Kristal ungu, didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan iodine dan didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan alkohol 96% sampai warna ungu hilang. Preparat ditetesi dengan larutan safranin dan didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat diamati di bawah mikroskop, uji gram bakteri dilakukan dengan melihat warna yang dipertahankan. Bakteri Gram

positif mempertahankan warna ungu dan bakteri Gram negatif mempertahankan warna merah.

3.5.7.4 Pewarnaan Endospora (Lay, 1994)

Pewarnaan endospora dilakukan untuk menentukan apakah bakteri berspora atau tidak. Prinsipnya adalah penggunaan pewarna *Malachit green* dan safranin. Uji positif jika sel vegetatif berwarna merah muda dan spora berwarna hijau. Pewarnaan endospora dilakukan dengan menyiapkan kaca preparat lalu ditetaskan aquades di atasnya, dibuat apusan bakteri dengan menggunakan jarum inokulum, lalu diratakan dengan kaca preparat perlahan dengan cara menggeser perlahan hingga menjadi tipis dan rata, difiksasi diatas api bunsen selama 5 detik. Ditetaskan larutan *Malachit green* diatas apusan bakteri tersebut, lalu dipanaskan diatas api bunsen selama 60 detik, dijaga sampai apusan tidak mengering, jika kering maka tambahkan larutan *Malachit green*. Kemudian dicuci dengan aquades atau air mengalir. Ditetaskan larutan safranin kemudian didiamkan selama 60 detik, dicuci dengan menggunakan aquades atau air mengalir, diamati dibawah perbesaran mikroskop dengan menggunakan minyak imersi.

3.5.8 Pembuatan Inokulum (Sukiman dan Nuriyanah, 2016)

Bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* ditumbuhkan pada media nutrient broth (NB) kemudian digojok selama 24 jam. Kepekatan suspensi bakteri diseragamkan dengan mengukur Optical Density (OD) yakni *Staphylococcus aureus* 0.2 dan *Eschericia coli* 0,23 pada panjang gelombang 600 nm.

3.5.9 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Endofit (Pratiwi, 2015)

Dibuat 2 media NB, satu media NB steril sebanyak 10 ml digunakan sebagai blanko dan satu media NB sebanyak 100 ml di inokulasikan biakan murni bakteri endofit sebanyak 1 ose. Spektrofotometer UV-vis diatur dengan panjang gelombang 600 nm, kuvet dibersihkan kemudian diukur absorbansi awal NB steril sebagai blanko dan NB yang mengandung bakteri pada menit ke-0 (t_0). Setelah absorbansi awal ditentukan, kemudian media NB berisi bakteri dishaker dengan kecepatan 150 rpm, pada suhu 37 °C, menggunakan *shaker incubator*. Setiap interval 2 jam dilakukan pengukuran absorbansi untuk mendapatkan kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan diakhiri setelah mencapai fase stasioner akhir.

3.5.10 Produksi Metabolit Sekunder Bakteri Endofit Termodifikasi (Sukiman dan Nuriyana, 2016)

Isolat bakteri endofit diambil satu ose diinokulasikan pada 10 mL media NB. Kemudian dishaker sampai mencapai waktu pertumbuhan fase logaritmik. Diambil 10% dengan OD 0,4 dari hasil inokulasi dan diinokulasikan kembali pada 100 mL media NB. Kemudian dishaker kembali sampai mencapai waktu pertengahan fase stasioner. Selanjutnya disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm, selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan diambil sebagai ekstrak metabolit sekunder bakteri endofit.

3.5.11 Uji Aktivitas Antibakteri (Fitriyah, 2015)

Uji antibakteri dilakukan berdasarkan metode uji Kirby-Bauer dengan menggunakan kertas cakram. Kertas cakram dibuat dari kertas *whatman* dengan

diameter 6 mm. Secara aseptik kertas cakram steril direndam dalam 50 µl ekstrak sampel bakteri endofit selama 30 menit. Kemudian kertas cakram diambil dengan pinset steril dan diletakkan diatas medium uji aktifitas antibakteri (Medium padat NA dalam cawan petri). Kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37⁰C. Diamati zona hambat yang terbentuk dan diukur diameternya. Sampel yang mempunyai aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat disekitar kertas cakram. Sebagai kontrol positif digunakan klorampenikol 30 µg dan kontrol negatif digunakan kertas cakram steril kosong. Pengujian setiap isolat yang didapat dilakukan tiga kali pengulangan.

Zona hambat diukur dengan menggunakan penggaris untuk menentukan aktivitas bakteri. Luas zona hambat ditentukan dengan rumus (Simarmata, 2007):

$$Lz = Lav - Ld$$

Keterangan:

Lz = Luas zona hambat (mm)

Lav = Luas keseluruhan zona hambat (mm)

Ld = Luas diameter kertas cakram (mm)

Hasil dari pengukuran zona hambat dibandingkan dengan kriteria kekuatan daya hambat bakteri. Kriteria daya hambat bakteri yang digunakan adalah kuat (zona hambat >6 mm), sedang (zona bening 3-6 mm), lemah (0-3 mm) (Pan, dkk., 2009).

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari tahap pertama adalah bentuk koloni, permukaan koloni, tepi koloni, warna koloni, jenis Gram, bakteri membentuk spora atau tidak dan aktivitas katalase. Data tersebut kemudian di bandingkan dengan pedoman identifikasi bakteri, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Pada tahap kedua uji aktivitas antibakteri didapatkan diameter zona hambat yang diinterpretasikan dalam bentuk gambar dan tabel.



BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Pletekan (*Ruellia tuberosa L*)

Bakteri endofit merupakan bakteri yang hidup didalam jaringan tanaman, interaksi antara bakteri endofit dengan tanaman adalah simbiosis mutualisme. Isolasi bakteri endofit pada penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan koloni bakteri yang hidup dalam jaringan akar tanaman pletekan. Sampel segar diambil dengan panjang 1 cm dan diameter 0,3 cm. Sterilisasi permukaan dilakukan dengan menggunakan larutan desinfektan, yang berfungsi untuk menghilangkan kontaminasi dari mikroba epifit dan mikroba tanah. Desinfektan yang digunakan adalah alkohol 70%, NaOCl 5,32% dan aquades steril sebagai dekontaminasi. Metode sterilisasi permukaan yang digunakan menunjukkan hasil yang efektif dengan ditunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba pada media kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri yang tumbuh merupakan bakteri endofit.

Isolasi bakteri endofit dilakukan dengan dua metode. Metode tempel (*peace plant*) dilakukan dengan membelah akar steril menjadi dua bagian secara aseptik. Secara langsung bekas belahan diinokulasikan pada media padat cawan petri berbeda dan diinkubasi selama 2-5 hari. Sedangkan metode sebar (*spread plate*) dilakukan dengan menghaluskan sampel dan 2 ml aquades steril, kemudian dilakukan pengenceran bertingkat 10^{-1} sampai 10^{-10} dengan mengambil 1 ml dari pengenceran sebelumnya kedalam 9 ml larutan NaCl 0,85% steril. Setiap pengenceran dari 10^{-3} sampai 10^{-10} ditanam pada media padat NA dalam cawan petri berbeda. Kemudian dilakukan inkubasi selama 2-3 hari pada suhu ruang.

Setiap koloni bakteri berbeda yang tumbuh dimurnikan dalam media padat pada cawan petri secara *streak* kuadran. Isolat murni diremajakan dalam media miring.

Hasil isolasi (isolat) bakteri endofit yang tumbuh dilakukan identifikasi dengan mengamati morfologi secara makroskopis. Menurut Mesa, dkk. (2015), identifikasi morfologi bakteri dapat dilakukan dengan mengamati berdasarkan bentuk, tepi, permukaan dan warna koloni. Hasil seleksi dimurnikan dengan menggunakan metode *streak* kuadran sehingga didapatkan 9 isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan.

Tabel 4.1 Morfologi isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan

Isolat	Morfologi Koloni			
	Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna
1A	Filamentous	Undulate	Flat	White
1B	Irregular	Lobate	Raised	White
1C	Spindel	Entire	Raised	Cream
1D	Spindel	Entire	Raised	Cream
1E	Irregular	Entire	Flat	Cream
1F	Circular	Entire	Flat	Cream
2A	Irregular	Erose	Flat	White
2B	Circular	Entire	Flat	White
2C	Irregular	Erose	Flat	Cream

Hasil isolasi bakteri endofit akar tanaman pletekan didapatkan sebanyak 9 isolat berbeda yang diperoleh dengan metode tempel (*peace plant*) sebanyak 3 isolat yakni isolat 2A, 2B dan 2C. Metode sebar (*spread plate*) didapatkan sebanyak 6 isolat yakni 1A, 1B, 1C, 1D, 1E dan 1F. Hal tersebut dikarenakan pada metode *spread plate* sampel dihaluskan, sehingga bakteri akan lebih mudah tersebar kemedialnya dibandingkan dengan metode *peace plant*. Berdasarkan hasil penelitian Sulistiyani dan Winarsih (2014), menunjukkan bahwa metode sebar (*spread plate*) merupakan metode yang efektif dalam isolasi bakteri endofit.

Setiap isolat diinokulasikan pada media NA miring sebagai stok, isolat murni bakteri endofit akar tanaman pletekan, selanjutnya dilakukan identifikasi minimal 3 parameter yakni uji pewarnaan Gram, pewarnaan endospora dan uji katalase (Christensen, dkk., 2007).

4.2 Identifikasi Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletekan (*Ruellia tuberosa* L)

Identifikasi meliputi uji katalase dan identifikasi mikroskopis yang dilakukan untuk mengetahui perbedaan karakteristik setiap sel isolat bakteri secara husus. Uji mikroskopis digunakan sebagai suatu langkah identifikasi struktur intraseluler bakteri untuk semua morfologi (Prescott, 2002). Identifikasi mikroskopis meliputi pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora.

4.2.1 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk membedakan bakteri berdasarkan kemampuannya dalam memproduksi enzim katalase atau peroksidase yang mampu mengkatalis reaksi pelepasan O_2 dari H_2O_2 (Iwake, dkk., 2013). Hasil uji katalase 9 isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan menunjukkan 8 isolat positif memiliki aktivitas katalase dan 1 isolat tidak memiliki aktivitas katalase. Hasil identifikasi keseluruhan disajikan dalam Tabel 4.3.

Tabel 4.2 Uji katalase isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan

Isolat	Uji Katalase
1A	+
1B	+
1C	+
1D	+
1E	+
1F	-
2A	+
2B	+
2C	+

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa 8 isolat memiliki kemampuan dalam memproduksi enzim katalase atau peroksidase. Delapan isolat positif uji katalase merupakan golongan bakteri aerob. Hal ini dapat dilihat dari kemampuannya dalam memproduksi enzim katalase atau peroksidase yang mampu medekstruksi hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan oksigen bebas (Prescott, 2002).



Bakteri aerob merupakan golongan bakteri yang membutuhkan oksigen bebas untuk proses pertumbuhannya (Willey dan Woolverton., 2014). Oksigen bebas digunakan sebagai aseptor terminal elektron untuk transpor elektron pada mitokondria pada proses respirasi serta untuk sintesis sterol dan asam lemak jenuh.

Isolat 1F bakteri endofit akar tanaman pletekan tidak menunjukkan adanya aktifitas katalase. Isolat 1F merupakan golongan bakteri anaerob, meskipun tidak mampu memproduksi enzim katalase namun isolat 1F diduga

memiliki enzim *superoxide reductase* yang berfungsi untuk mereduksi ion superoksida (O_2^-). Ion O_2^- direduksi menjadi peroksida (H_2O_2), tanpa menghasilkan gelembung O_2 (Madigan, dkk., 2012).



Bakteri golongan anaerob merupakan bakteri yang tidak membutuhkan oksigen bebas untuk proses pertumbuhannya. Keberadaan oksigen bebas berbahaya bagi komponen selnya karena merupakan senyawaan toksik (Prescott, 2002). Sehingga selama proses respirasi pada mitokondria, yang berperan sebagai elektron donor adalah *rubredoxin*, merupakan sebuah kompleks protein besi sulfur yang memiliki potensial reduksi rendah. Sedangkan produk H_2O_2 akan di rubah oleh enzim yang serupa dengan peroksidase menghasilkan produk air (H_2O) (Madigan, dkk., 2012).

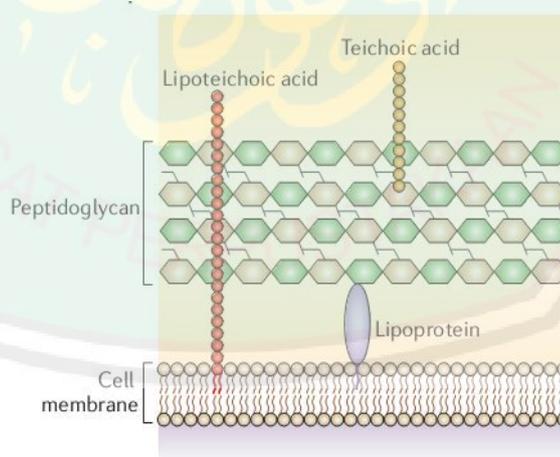
4.2.2 Pewarnaan Gram

Uji pewarnaan Gram bertujuan untuk mengidentifikasi isolat bakteri endofit dari akar tanaman pletekan kedalam golongan besar bakteri yaitu Gram positif dan Gram negatif. Uji pewarnaan Gram bakteri didasarkan atas ketebalan dinding sel suatu bakteri. Pada uji pewarnaan Gram digunakan pewarna kimia kristal violet sebagai pewarna primer dinding sel bakteri Gram positif dan safranin sebagai pewarna dinding sel Gram negatif. Hasil uji pewarnaan Gram dari 9 isolat merupakan golongan bakteri Gram positif.

Tabel 4.3 Uji pewarnaan Gram isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan

Isolat	Uji Pewarnaan		
	Gram	Bentuk Sel	Ukuran Sel
1A	+	Batang	3,29 μm
1B	+	Batang	2,40 μm
1C	+	Batang	2,29 μm
1D	+	Batang	1,66 μm
1E	+	Batang	1,24 μm
1F	+	Batang	1,40 μm
2A	+	Batang	4,04 μm
2B	+	Batang	1,96 μm
2C	+	Batang	1,33 μm

Bakteri Gram positif tidak memiliki membran sel luar, namun memiliki dinding sel peptidoglikan diluar membran sel lebih banyak dibanding Gram negatif. Sehingga senyawa yang terbentuk antara kristal violet dengan iodin pada pewarnaan Gram mengendap di dalam sitoplasma dan tidak dapat dengan mudah di cuci untuk melewati lapisan peptidoglikan (Athukorala, dkk., 2014).



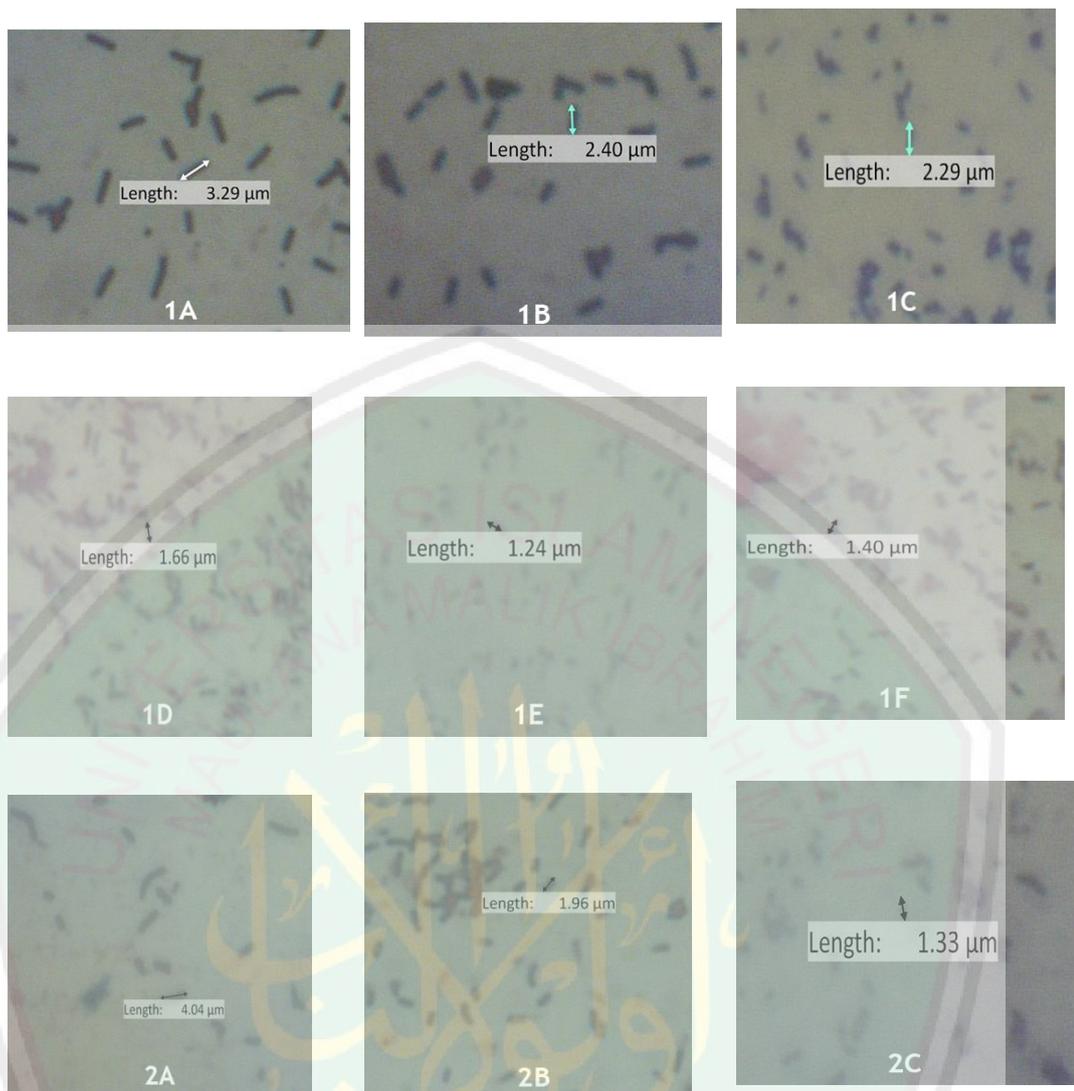
Gambar 4.1 Struktur dinding sel bakteri Gram positif

Kristal violet akan memberikan warna ungu dalam dinding sel. Kristal violet yang mampu menembus dinding sel kemudian bereaksi dengan larutan iodine. Larutan iodine sebagai pengikat kristal violet, senyawa yang terbentuk antara kristal violet (CV⁺) dengan iodine (I⁻) memberikan warna ungu gelap. Dugaan mekanisme reaksinya adalah sebagai berikut:



Gambar 4.2 Mekanisme reaksi kristal violet dengan iodine (Davies, dkk., 1983).

Senyawa CV-I merupakan senyawa yang sukar larut dalam air yang terperangkap didalam dinding sel. Pemberian dekolorizer alkohol akan mendehidrasi dinding sel bakteri gram positif. Sehingga akan terbentuk pori-pori yang menyebabkan senyawa CV-I masuk dan memberikan warna ungu pada membran multilayer. Safranin sebagai pewarna kimia tandingan yang juga merupakan pewarna primer bakteri gram negatif tidak akan dipertahankan oleh bakteri Gram positif. Safranin akan dipertahankan oleh dinding sel bakteri Gram negatif karena bakteri Gram negatif kehilangan pewarna kristal violet ketika pembilasan dengan alkohol. Dinding sel luar dengan kandungan lipid yang banyak mudah ditembus oleh alkohol sehingga kristal violet tidak terperangkap. Sel bakteri Gram negatif akan tidak berwarna dan akan terwarnai dengan pewarna tandingan safranin (Madigan, dkk., 2012).



Gambar 4.3 Pewarnaan Gram isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan dengan perbesaran 1000x

Hasil uji pewarnaan Gram pada 9 isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan termasuk dalam golongan Gram positif. Bakteri memiliki ukuran yang sangat kecil dengan satuan mikrometer (μm). Ukuran panjang bakteri berkisar antara 0,5 – 5 μm (Mishra dan Chauhan, 2015). Hasil menunjukkan bahwa setiap isolat memiliki ukuran sel yang berbeda-beda. Ukuran sel terbesar adalah isolat 2A sebesar 4,04 μm sedangkan isolat 1E adalah isolat dengan ukuran sel terkecil

sebesar 1,24 μm . Terdapat beberapa faktor yang menyebabkan perbedaan ukuran sel koloni bakteri yaitu sebaran dan keberadaan nutrisi dalam medium, kekerasan agar dan adanya cairan pada permukaan media serta spesies isolat (Willey dan Woolverton., 2014).

4.2.3 Pewarnaan Endospora

Uji pewarnaan endospora didasarkan pada penentuan spora yang terbentuk dari sel vegetatif bakteri. Bakteri memiliki siklus hidup dalam proses pembentukan spora. Secara fungsional spora berfungsi dalam mempertahankan sel tetap hidup dalam kondisi lingkungan yang berbahaya. Sehingga sel bakteri yang mampu membentuk spora akan memiliki sifat tahan terhadap panas, asam, radiasi, lysozim dan pewarna kimia serta pewarnaan (Rhatod, 2003).

Pewarnaan endospora dilakukan dengan menggunakan pewarna kimia *malachit green*. Endospora memiliki membran sel yang berlapis lapis (Mckenney, dkk. 2013). Struktur tersebut menjadikan proses pewarnaan sulit dilakukan, sehingga selama proses pewarnaan dilakukan pada suhu 50°C (Geo, dkk. 2013). Pemanasan dimaksudkan untuk membantu masuknya pewarna *malachit green* menembus dinding sel bakteri. Sehingga sel bakteri yang positif spora akan terwarnai hijau atau terlihat rongga di dalam sel. *Malachit green* akan memberikan warna pada dinding luar spora (*outer spore coat*) dan akan sedikit tersimpan pada *outer pericortex* (Kozuka dan Tochikubo, 1991).

Proses pewarnaan endopsora dilakukan ketika proses pembentukan spora (spoluasi) berada pada fase spora muda (awal). Hal tersebut dilakuakn karena pada fase spora muda tidak tahan terhadap *decoloration* (Barrow, dkk. 2003).

Sehingga sel bakteri dapat mempertahankan dan atau melepas pewarna yang diberikan. Pewarnaan endospora dapat dilakukan setelah masa pertumbuhan bakteri lebih dari 24 jam (Knaysi, 1948). Endospora bakteri genus *Bacillus* spp terbentuk pada waktu pertumbuhan 5-7 hari (Todar, 2012). Hasil pewarnaan akan terlihat lebih jelas dibawah mikroskop.

Tabel 4.4 Pewarnaan endopsora isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan

Isolat	Pewarnaan Endospora
1A	+
1B	+
1C	-
1D	+
1E	-
1F	-
2A	+
2B	+
2C	+

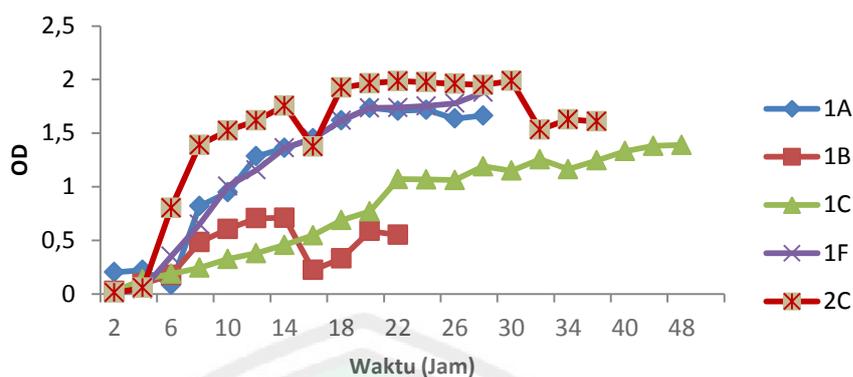
Hasil pewarnaan endospora untuk 9 isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan menunjukkan bahwa 6 isolat positif mampu membentuk endospora dan 3 diantaranya tidak mampu membentuk endospora. Dugaan genus bakteri endofit akar tanaman pletekan berdasarkan *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1994). Isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan menunjukkan bahwa isolat 1A, 1B, 1D, 2A, 2B dan 2C termasuk dalam genus *Bacillus* spp. Sedangkan isolat 1C dan 1E termasuk dalam genus *Corynebacterium* spp dan isolat 1F termasuk dalam genus *Lactobacillus* spp.

Bakteri genus *Bacillus* spp biasa ditemukan dalam tanah dan merupakan bakteri saprofit (Breed, dkk., 1957). Bakteri *Bacillus* mampu memproduksi antibiotik seperti bacitracin dan polymixin, sedangkan *Bacillus thuringiensis*

dapat digunakan sebagai insektisida alami (Hog, 2005). Bakteri dalam genus *Corynebacterium spp* merupakan bakteri yang banyak ditemukan di alam sebagai bakteri patogen pada manusia, hewan dan tanaman (Breed, dkk., 1957). Bakteri *Corynebacterium accolens* memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* dengan menghasilkan senyawa antibakteri asam lemak bebas (Bomar, dkk., 2016). Sedangkan bakteri dalam genus *Lactobacillus spp* termasuk dalam famili *Lactobacilleae* yang banyak ditemukan dalam fermentasi produk hewani dan nabati (Breed, dkk., 1957). *Lactobacillus spp* mampu memproduksi senyawa antibakteri bakteriosin yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen pada udang seperti *Vibrio harveyi* (Sivakumar, dkk., 2014).

4.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletekan (*Ruellia tuberosa* L)

Kurva pertumbuhan bakteri memberikan gambaran mengenai fase pertumbuhan suatu bakteri, meliputi fase lag (adaptasi), fase log (eksponensial), fase statif (stationer) dan fase kematian (Madigan, dkk., 2012). Pada fase stasioner kondisi bakteri stabil antara bakteri mati dan hidup, kondisi ini juga merupakan kondisi dimana bakteri memproduksi metabolit sekunder. Hasil identifikasi fase pertumbuhan 5 isolat terpilih bakteri endofit akar tanaman pletekan dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.4 Kurva pertumbuhan isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan.

Hasil pengamatan fase pertumbuhan isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan digunakan sebagai acuan penentuan fase stasioner. Metabolit sekunder bakteri diproduksi pada fase akhir stasioner (Pelczar, dkk., 1986). Metabolit sekunder yang dihasilkan digunakan oleh bakteri sebagai bentuk pertahanan diri. Untuk bertahan dalam kondisi lingkungan ekstrim, dimana sediaan nutrisi untuk melakukan metabolisme sangat sedikit. Pengamatan pertumbuhan isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan dilakukan dengan interval 2 jam dan dilakukan sampai jam ke-52. Setiap isolat bakteri memiliki waktu pertumbuhan yang berbeda. Hasil pengamatan keseluruhan disajikan pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Fase pertumbuhan isolat bakteri endofit

Fase	Waktu Pertumbuhan (jam)				
	1A	1B	1C	1F	2C
Lag	6	4	4	10	6
Logaritmik	18	6	18	18	15
Stasioner	28	22	48	28	36

Waktu pertumbuhan mencapai fase stasioner akhir tiap isolat menunjukkan bahwa isolat 1C menunjukkan waktu pertumbuhan yang cukup lama hingga

mencapai fase stasioner akhir selama 48 jam. Sedangkan isolat 1B memiliki waktu pertumbuhan terpendek hingga mencapai fase stasioner akhir selama 22 jam. Sedangkan isolat 1A dan 1F selama 28 jam, sedangkan isolat 2C selama 36 jam.

Perbedaan fase pertumbuhan setiap isolat dikarenakan adanya perbedaan metabolisme setiap sel isolat bakteri. Konsentrasi CO₂ yang dihasilkan selama proses fermentasi dengan medium kultur *Nutrien Broth* merupakan salah satu yang memberikan efek pada pertumbuhan bakteri. Semakin tinggi konsentrasi CO₂ selama proses fermentasi maka akan mempercepat pertumbuhan bakteri (Salle, 1943). Selain itu penentuan pertumbuhan bakteri terdapat beberapa faktor yakni konsentrasi zat terlarut dalam medium, pH optimum pertumbuhan bakteri, temperatur optimum pertumbuhan bakteri, keberadaan oksigen bebas (O₂) dan spesies isolat (Willey dan Woolverton., 2014). Sehingga dalam beberapa kasus penentuan waktu pertumbuhan bakteri memiliki perbedaan waktu pertumbuhan meskipun berada pada satu lingkungan (habitat) yang sama.

Beberapa penelitian terdahulu bakteri endofit sebagai penghasil metabolit sekunder sebagai antibakteri seperti pada tanaman mangrove memiliki waktu inkubasi untuk produksi metabolit sekunder selama 120 jam (Gayathri dan Muralikrishnan, 2013). Isolat bakteri endofit rhizome *Curcuma longa* selama 5 hari (Sulistiyani dan Winarsih., 2016). Isolat bakteri endofit akar tanaman Purwoceng selama 24 jam (Purwestri, dkk., 2016). Isolat bakteri endofit umbi tanaman dahlia waktu maksimum 72 jam (Elita dan Christine., 2013).

4.4 Uji Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman

Pletekan (*Ruellia tuberosa* L)

4.4.1 Pembuatan Inokulum Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletekan

Pembuatan inokulum dilakukan untuk memberikan waktu kepada isolat bakteri dalam melakukan penyesuaian dengan habitat baru sebelum siap untuk produksi metabolit sekunder. Pada pembuatan inokulum ini setiap isolat dari 5 isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan diinokulasikan sebanyak 1 ose pada 25 ml media cair. Inokulum diinkubasi selama mencapai fase log akhir dari masing-masing kurva pertumbuhan isolat. Isolat 1A dan 1F dilakukan inkubasi hingga mencapai 18 jam. Isolat 1B diinkubasi selama 6 jam, 1C dilakukan inkubasi selama 18 jam dan isolat 2C diinkubasi selama 15 jam.

Setiap inokulum dilakukan penyeragaman konsentrasi sebelum digunakan sebagai inokulum kerja produksi metabolit sekunder. Diambil masing-masing inokulum dan dilakukan pengukuran OD (optical density) pada panjang gelombang 600 nm. Setiap inokulum yang digunakan memiliki kekeruhan setara dengan OD 0,4. Penyeragaman dilakukan dengan mengencerkan inokulum isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan dengan menggunakan media cair NB steril.

4.4.2 Produksi Metabolit Sekunder

Produksi metabolit sekunder dilakukan untuk menghasilkan metabolit sekunder dari isolat terpilih sesuai dengan waktu pertumbuhannya hingga mencapai fase stasioner akhir. Sebanyak 5 inokulum isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan diambil sebanyak 2,5 ml setiap isolat dengan OD 0,4 dan dimasukkan kedalam media produksi sebanyak 100 ml. Setiap isolat diinkubasi

hingga mencapai fase stationer akhir. Setiap bakteri akan memproduksi metabolit sekunder sebagai bentuk pertahanan diri dari bahaya lingkungan pada fase stationer akhirnya (Pelczar, dkk., 1986).

Setiap isolat hasil inkubasi dilakukan produksi metabolit sekunder dengan memisahkan antara sel dan ekstrak kasar metabolit sekunder. Proses pemisahan ini dilakukan dengan menggunakan metode sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4 °C. Sentrifugasi akan memisahkan sel dengan ekstrak kasar metabolit sekunder yang dihasilkan.

4.4.3 Uji Aktivitas Antibakteri

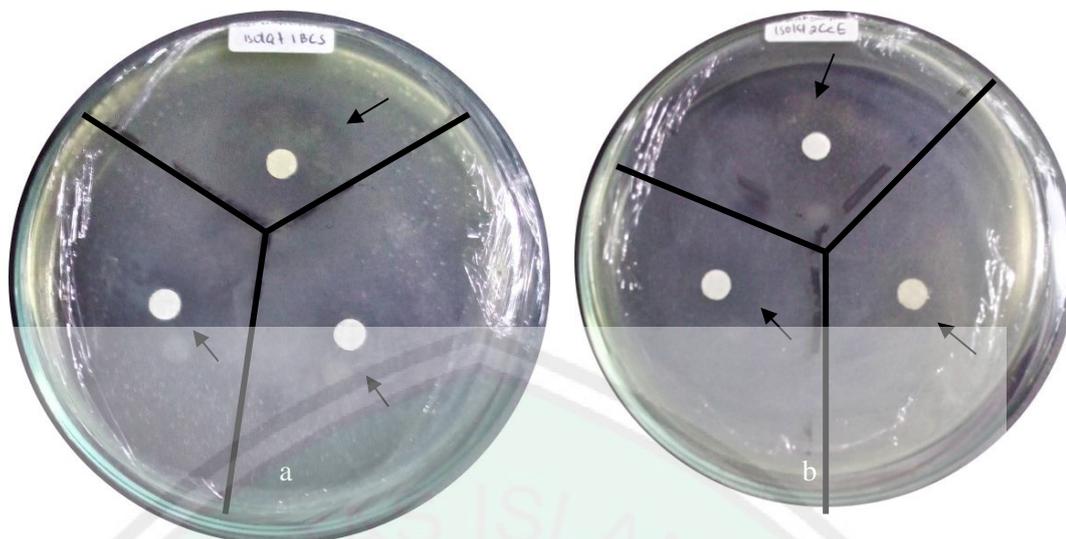
Bakteri endofit memiliki keunggulan dalam kemampuannya untuk memproduksi metabolit sekunder yang spesifik dengan tanaman inang. Hal ini yang menjadikan bakteri endofit adalah sumber hayati yang besar dengan keanekaragamannya. Berdasarkan penelitian terdahulu, Kader, dkk., (2012) dan Aisyi, (2016) menunjukkan bahwa ekstrak etanol akar pletekan mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen seperti *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*. Sehingga perlu diuji aktivitas antibakteri dari setiap isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan terhadap mikroorganisme patogen Gram negatif *Eschericia coli* dan Gram positif *Staphylococcus aureus*. Sehingga dapat diketahui spektrum aktivitas antibakteri dari setiap ekstrak kasar isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan.

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kasar metabolit sekunder bakteri endofit akar tanaman pletekan di sajikan pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Aktivitas antibakteri ekstrak kasar metabolit sekunder isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan

Isolat	Aktivitas Antibakteri			
	Eschericia coli		Staphylococcus aureus	
	Zona Hambat (mm)	Keterangan	Zona Hambat (mm)	Keterangan
1A	4,25	Sedang	5,67	Sedang
1B	4,18	Sedang	6,3	Kuat
1C	3,88	Sedang	4,25	Sedang
1F	4,13	Sedang	5,5	Sedang
2C	5,7	Sedang	3,75	Sedang
Kontrol Positif	36,6	Kuat	32	Kuat

Aktivitas antibakteri ekstrak kasar metabolit sekunder dilakukan dengan menggunakan kertas cakram steril 6 mm dan direndam dalam ekstrak kasar sebanyak 50 µl setiap kertas cakram selama 30 menit. Kontrol positif digunakan antibiotik klorampenikol 2 ppm. Bakteri patogen yang digunakan sebanyak $7,8 \times 10^8$ cfu untuk bakteri *Eschericia coli* setara dengan OD 0,27 dan $2,79 \times 10^8$ cfu untuk bakteri *Staphylococcus aureus* setara dengan OD 0,2 (dalam lampiran). Uji antibakteri secara In vitro ini memiliki beberapa faktor yang mempengaruhi diameter zona hambat yang muncul. Strobel (2003), mengatakan bahwa zona hambat yang terbentuk dipengaruhi oleh jenis bakteri patogen uji dan spesies isolat bakteri endofit yang berhasil terisolasi.



Gambar 4.5 Zona hambat uji antibakteri ekstrak kasar isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan (a) isolat 1B terhadap *Staphylococcus aureus*, (b) isolat 2C terhadap *Escherichia coli*.

Aktivitas antibakteri dari ekstrak kasar metabolit sekunder 5 isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan memiliki sensitifitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen dengan spektrum yang luas. Antibakteri dikatakan memiliki spektrum yang luas dimana senyawa antibakteri mampu menghambat atau membunuh bakteri patogen baik Gram positif maupun negatif (Tortora, dkk., 2001). Dari hasil uji aktivitas dengan metode difusi cakram, menunjukkan adanya zona hambat yang kurang kuat dibandingkan dengan kontrol positif menggunakan antibiotik kloramfenikol. Hasil pengujian setiap isolat menunjukkan adanya aktivitas penghambatan dengan ditunjukkannya zona hambat yang dapat di ukur secara kuantitatif.

Ekstrak kasar metabolit sekunder isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan yang memiliki sensitifitas tertinggi dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Escherichia coli* adalah isolat 2C dengan nilai penghambatan sebesar 5,7 mm, sedangkan isolat 1B memiliki sensitifitas tertinggi dalam

menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dengan nilai penghambatan sebesar 6,3 mm. Menurut Pan, dkk (2009), aktivitas antibakteri yang memiliki zona hambat 0-3 mm merupakan respon penghambatan pertumbuhan lemah, 3-6 mm respon penghambatan sedang dan ≥ 6 mm memiliki respon penghambatan kuat. Isolat 2C dapat dikatakan memiliki respon penghambatan sedang terhadap pertumbuhan bakteri patogen *Eschericia coli*. Isolat 1B memiliki respon penghambatan yang kuat terhadap pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antibakteri isolat 1A, 1C dan 1F terhadap bakteri uji memiliki respon penghambatan sedang. Secara berturut-turut aktivitas antibakteri isolat 1A, 1C dan 1F terhadap bakteri patogen *Eschericia coli* sebesar 4,25, 3,88 dan 4,13 mm, terhadap *Staphylococcus aureus* sebesar 3,67, 4,25 dan 5,5 mm.

Hasil aktivitas antibakteri yang ditunjukkan pada Tabel 4.5 menunjukkan bahwa bakteri *Staphylococcus aureus* lebih sensitif terhadap ekstrak kasar metabolit sekunder dari 5 isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan. Hal ini dikarenakan adanya senyawa aktif golongan fenolik yang diduga diproduksi oleh bakteri endofit akar tanaman pletekan seperti flavonoid dan tanin (Afzal, dkk., 2015). Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif dengan komposisi peptidoglikan pada dinding sel lebih banyak dibandingkan bakteri Gram negatif. Senyawa aktif golongan fenolik memiliki aktivitas dalam mendenaturasi protein sel dan merusak membran sitoplasma pada bakteri. serta menghambat sintesis peptidoglikan (Retnowati, dkk., 2011), sehingga bakteri *Staphylococcus aureus* akan lebih mudah dihambat pertumbuhannya oleh ekstrak kasar metabolit sekunder dari 5 isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan

dibandingkan bakteri *Eschericia coli*. Sedangkan pada bakteri *Eschericia coli* yang merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki komposisi dinding sel mengandung golongan lipid seperti lipopolisakarida, fosfolipi dan lipoprotein pada dinding lapisan terluarnya. Hal tersebut menyebabkan *Eschericia coli* lebih sensitif terhadap golongan senyawa aktif glikoksida yaitu saponin yang juga diduga diproduksi oleh bakteri endofit akar tanaman pletekan, dikarenakan adanya susunan aglikon yang larut dalam air dan lemak (Gluclu dan Mazza, 2007).

Mekanisme kerja beberapa senyawa aktif yang diduga diproduksi oleh bakteri endofit akar tanaman pletekan seperti, tanin dalam aktivitasnya sebagai antibakteri bekerja dengan jalan menghambat sintesis dinding sel bakteri. Penghambatan dilakukan dengan membentuk kompleks dengan prolene yang merupan α -asam amino yang digunakan dalam proses sintesis protein (Mujeeb, dkk., 2014). Senyawa flavonoid mampu membentuk kompleks dengan protein melalui kekuatan non-spesifik seperti membentuk ikatan hidrogen dan efek hidrofobik dengan membentuk ikatan kovalen. Flavonoid juga mampu menonaktifkan sistem transport protein sel, enzim dan adhesins pada bakteri (Kumar dan Pandey, 2013). Metabolit sekunder tanin dan flavonoid merupakan golongan senyawa fenolik yang memiliki gugus fungsi hidroksil yang memiliki sifat toksik terhadap mikroorganisme (Bobbarala, 2012). Sedangkan saponin merupakan senyawa yang membentuk busa pada air. Saponin merupakan senyawaan yang beracun yang menyebabkan lisis sel (Godstime, dkk., 2014). Selain itu saponin juga menyebabkan kerusakan pemetukan struktur protein dan beberapa enzim selular (Mujeeb, dkk., 2014).

4.5 Isolasi Bakteri Berdasarkan Prespektif Islam

Manusia sebagai makhluk yang sempurna dari semua ciptaan Allah SWT telah diberkahi sebuah akal untuk memikirkan segala bentuk ciptaan-Nya. Allah SWT telah menciptakan berbagai bentuk yang tercipta di alam beserta isinya. Sebagai makhluk yang memiliki akal, maka seharusnya manusia selalu memikirkan tentang segala bentuk ciptaan-Nya. Sesungguhnya segala macam ciptaan Allah SWT mengandung sebuah pelajaran bagi manusia untuk kemaslahatan manusia itu sendiri. Allah SWT berfirman dalam surat Al-Hijr : 19-20.

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا فِيهَا رَوَاسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَّوْزُونٍ ﴿١٩﴾ وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعَايِشَ وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرَازِقِينَ ﴿٢٠﴾

“Dan Kami telah menghamparkan bumi dan menjadikan padanya gunung-gunung dan Kami tumbuhkan padanya segala sesuatu menurut ukuran (19). Dan Kami telah menjadikan untukmu di bumi keperluan-keperluan hidup, dan (Kami menciptakan pula) makhluk-makhluk yang kamu sekali-kali bukan pemberi rezeki kepadanya (20)”.

Ayat diatas menerangkan bahwa segala yang diciptakan Allah SWT merupakan sebuah nikmat dan memiliki hikmah dari setiap penciptaannya. Kalimat *وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعَايِشَ* pada ayat ke-20 menerangkan bahwa Allah telah memberikan kepada manusia di bumi berbagai sarana dan penghidupan. Sedangkan dalam kalimat penutup ayat ke-20 *وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرَازِقِينَ* memiliki makna bahwa Allah telah menciptakan binatang melata dan ternak (Al-Sheikh, 2003). Merujuk pada kata *دَابَّةٍ* pada surat An-nur, Departemen Agama RI menafsirkan bakteri termasuk dalam golongan hewan yang bergerak dimuka bumi.

As-Shiddieqy, (2000) menyatakan bahwa semua dalam penciptaan Allah baik tumbuhan, hewan maupun benda-benda mati memiliki hikmah dan maslahat walaupun tidak diketahui (terpikirkan) dalam benak manusia. Dalam kasus ini peneliti mencoba mempelajari ciptaan Allah SWT dalam tanaman liar pletakan (*Ruellia tuberosa L*). Tanaman yang memiliki kemampuan menghasilkan metabolit sekunder potensial untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen (Afzal, dkk., 2015). Allah SWT telah menciptakan suatu makhluk hidup didalam makhluk hidup lainnya. Kenyataan tersebut tidak terfikirkan, namun berdasarkan alasan logis pentingnya memikirkan ciptaan Allah SWT dan tujuan dari pemikiran itu dijelaskan Allah SWT dalam surat Al-Jaatsiyah : 13, Allah SWT menjelaskan mengenai pentingnya memikirkan segala ciptaan Allah SWT dan tujuan dari pemikiran tersebut.

وَسَخَّرَ لَكُم مَّا فِي السَّمٰوٰتِ وَمَا فِي الْاَرْضِ جَمِيعًا مِّنْهُ ۗ اِنَّ فِيْ ذٰلِكَ لَآيٰتٍ لِّقَوْمٍ يَّتَفَكَّرُوْنَ ﴿١٣﴾

“Dan Dia telah menundukkan untukmu apa yang di langit dan apa yang di bumi semuanya, (sebagai rahmat) dari pada-Nya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang berfikir (13)”.

Tafsir Jalalain (2007), menjelaskan makna سَخَّرَ sebagai sesuatu untuk dimanfaatkan. Dijelaskan dalam surat tersebut berbagai macam ciptaan Allah SWT seperti السَّمٰوٰتِ , الْاَرْضِ جَمِيعًا مِّنْهُ , semuanya itu dapat dimanfaatkan. Segala sesuatu apa yang ada di bumi seperti tanaman, hewan, termasuk didalamnya bakteri dan benda mati segalanya dapat dimanfaatkan. Dari kalimat penutup ayat tersebut tersirat bahwa manusia adalah satu-satunya makhluk yang diberikan akal untuk berfikir, sehingga orang yang memiliki akal bisa dikatakan sebagai kaum

يَتَفَكَّرُونَ. Tujuan dalam berfikir tentang ciptaan Allah SWT adalah suatu keyakinan ketauhidan akan kekuasaan Allah SWT.

Berfikir mengenai makhluk hidup yang hidup didalam makhluk hidup lainnya. Bakteri endofit merupakan salah satu jenis dari mikroorganisme yang hidup didalam jaringan tumbuhan. Potensi bakteri endofit telah banyak diteliti sebagai sumber produksi metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya (Brade, dkk., 2014). Sehingga untuk pemanfaatan metabolit sekunder dari tanaman pletakan dapat dilakukan dengan melakukan isolasi bakteri endofit didalamnya.

Isolasi dalam penelitian ini dilakukan dengan mengambil sebagian kecil dari akar tanaman pletakan, sehingga tanaman pletakan tetap bisa tumbuh dan lestari. Bakteri endofit akar tanaman pletakan memiliki kemampuan memproduksi metabolit sekunder yang mirip dengan tanaman inang (Gouda, dkk., 2016). Diketahui dari penelitian terdahulu mengenai kandungan metabolit sekunder tanaman pletakan adalah saponin, flavonoid dan tanin. Semua metabolit tersebut dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri pada bakteri patogen. Rasulullah bersabda dalam sebuah hadis riwayat Ahmad, Abu Dawud dan At-Tirmidzi.

أَنَّ اللَّهَ عَزَّ وَجَلَّ لَمْ يُنَزِّلْ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ دَوَاءً غَيْرَ دَاءٍ وَاحِدٍ قَالُوا يَا رَسُولَ اللَّهِ وَمَا هُوَ قَالَ لَأَهْرَمُ

(رواه احمد وا ابوداود والترمذي)

“Berobatlah karena sesungguhnya Allah tidak menurunkan suatu penyakit, melainkan pula telah menurunkan obatnya, kecuali satu penyakit saja yaitu penyakit pikun”

Hadis diatas menjelaskan bahwa semua penyakit terdapat obatnya yang juga diturunkan oleh Allah SWT. Dalam penelitian ini ditemukan bahwa isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen pada manusia yakni terhadap bakteri *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Berikut dijelaskan oleh Allah SWT dalam surat Al-baqarah ayat 26 :

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي ۚ أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا ۚ فَأَمَّا الَّذِينَ ءَامَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ ۚ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا ۗ يُضِلُّ بِهِ ۚ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ ۚ كَثِيرًا ۗ وَمَا يُضِلُّ بِهِ ۚ إِلَّا الْفَاسِقِينَ ﴿٢٦﴾

“Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir mengatakan: “Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan?”. Dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah, dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik (26).”

Ayat diatas menjelaskan bahwa Allah menciptakan sesuatu lebih kecil dan hina bukanlah suatu hal yang remeh, yang tidak berfaedah. Seperti dalam kisah kematian raja Namrud oleh seekor nyamuk, menjadi sebuah pelajaran bagi kita. makna kata *فَمَا فَوْقَهَا* merupakan sesuatu yang lebih kecil dan hina. Maka dalam tafsir ibnu katsir dijelaskan bahwa Allah tidak memandang enteng penciptaannya (Al-Sheikh, 2003). Sehingga dengan sesuatu yang kecil dan hina seperti bakteri kita dapat mengambil manfaat dan pelajaran. Hal ini dibuktikan dari hasil penelitian ini, bahwa bakteri endofit akar tanaman pletekan berpotensi sebagai penghasil metabolit sekunder senyawa antibakteri. Hal inilah yang dimaksudkan

didalam al-qur'an bahwa manusia yang berakal akan selalu berproses dalam memikirkan setiap penciptaan-Nya.

Pada Proses pemikiran ini didasarkan pada tanggung jawab sebagai manusia yang berakal dalam memanfaatkan tanaman ciptaan Allah SWT tanpa menimbulkan kerusakan bahkan memusnahkan tanpa rasa tanggung jawab. Allah SWT berfirman dalam surat Al-Qashash : 77.

وَأَتَّبِعْ فِي مَآثِقِ اللَّهِ الدَّارَ الْآخِرَةَ وَلَا تَنْسَ نَصِيبَكَ مِنَ الدُّنْيَا وَأَحْسِنَ كَمَا أَحْسَنَ اللَّهُ إِلَيْكَ وَلَا تَبْغِ الْفُسَادَ فِي الْأَرْضِ ۚ إِنَّ اللَّهَ لَا يُحِبُّ الْمُفْسِدِينَ ﴿٧٧﴾

“Dan carilah pada apa yang telah dianugerahkan Allah kepadamu (kebahagiaan) negeri akhirat, dan janganlah kamu melupakan kebahagiaanmu dari (kenikmatan) duniawi dan berbuat baiklah (kepada orang lain) sebagaimana Allah telah berbuat baik, kepadamu, dan janganlah kamu berbuat kerusakan di (muka) bumi. Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang-orang yang berbuat kerusakan (77).”

Ayat tersebut mengarahkan kita untuk bertanggung jawab dalam memanfaatkan sumber daya alam yang dimiliki. Pada dasarnya adanya sumber daya alam berupa tanaman ini merupakan untuk kemaslahatan. Namun pemanfaatan yang terus menerus tanpa diimbangi dengan pelestarian maka akan berdampak negatif terhadap keseimbangan ekosistem dialam. Sehingga jika kenyataan ini terus dilakukan maka manusia adalah salah satu penyebab kerusakan dimuka bumi. Ditegaskan oleh Allah dalam kalimat pada ayat diatas وَلَا تَبْغِ الْفُسَادَ فِي الْأَرْضِ dimana kalimat tersebut memiliki makna jangan sampai semangatmu hanya menjadi perusak dimuka bumi (Al-Sheikh, 2003).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dalam penelitian ini maka dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Hasil penelitian didapatkan 5 isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan yaitu isolat 1A, 1B, 1C, 1F dan 2C. Isolat hasil isolasi bakteri endofit akar tanaman pletekan merupakan golongan Gram positif, isolat 1C negatif endospora, isolat 1F negatif katalase dan endospora.
2. Nilai aktivitas antibakteri setiap isolat 1A, 1B, 1C, 1F dan 2C terhadap bakteri *Eschericia coli*, secara berurutan sebesar 4,25 mm, 4,18 mm, 3,88 mm, 4,13 dan 5,7 mm. Dan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, sebesar 5,67 mm, 6,3 mm, 4,25 mm, 5,5 mm dan 3,75 mm.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ditemukan beberapa saran guna memperbaiki pada penelitian selanjutnya, antara lain:

1. Ekstrak kasar metabolit sekunder setiap isolat bakteri endofit akar tanaman pletekan sebaiknya dilakukan uji fitokimia, untuk mengetahui senyawa aktif yang berperan sebagai antibakteri.
2. Identifikasi isolat hasil isolasi dapat dilakukan sampai tingkat spesies, untuk mengetahui setiap spesies dari masing-masing isolat.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Mahally, Imam Jalaluddin dan Imama Jalaluddin As-Suyuthi. 2007. *Tafsir Jalalin Berikut Asbabun Nuzulnya*. Terjemahan Bahrnun Abu Bakar. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Al-Sheikh, Ishaq. 2003. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 5*. Terjemahan M. Abdul G, E. M., dan Abdurahim, M. Bogor: Pustaka Imam asy-Syafi'i.
- Amelia. 2015. Diakses dari <http://resepamelia.blogspot.co.id/2015/04/obat-diabetes-tanaman-pletakan-atau.html> pada 8 Januari 2017.
- Afzal, K., Uzair, M., Chaudhary, B. A., Ahmad, A., Afzal, S., dan Saadullah, M. 2015. Genul *Ruellia* Pharmacological and Phytochemical Importance in Ethnopharmacology. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*. 72(5): 821-827.
- Arirudran, B., Krishnamurthy, V., dan Saraswathy, A. 2011. Pharmacognostic And Preliminary Phytochemical Studies on *Ruellia Tuberosa L.* (Whole Plant). *Pharmacognosy Journal*, 3(23): 91-95.
- Asy-Shiddieqy, Tengku Muhammad H. 2000. *Tafsir Al-qur'anul Majid An-Nuur. Jilid 3 (Surat 24-41)*. Semarang: Pustaka Rizqi Putra.
- Aswathy, A. J., Jasim, B., Jyothis, M., dan Radhakrishnan, E. K. 2012 Identification of Two Strains of Paenibacillus Sp. As Indole 3 Aceticacid-Producing Rhizome-Associated Endophytic Bacteriafrom *Curcuma longa*. *Biotech Journal*. 3(3): 219-224.
- Athukorala, D. A. D., Kottahachchi, J., dan Dissanayake, T. 2014. *Medical Bacteriology Practical Manual*. University of Sri Jayewardenepura.
- Barrow, G. I, dan Feltham, R. K. A. 2003. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria 3rd Edition*. United Kingdom: Cambridge University Press.
- Bergey's. 1994. *Manual of Systematic Bacteriology. Department of Microbiology and Molecular Genetics*: Michigan State University.
- Bomar, L., Brugger, S. D., Yost, B. H., Davies, S. S., dan Lemon, K. P. 2016. *Corynebacterium accolens* Releases Antipneumococcal Free Fatty Acid from Human Nostril and Skin Surface Triacylglycerols. *American Society for Microbiology*. 7(1): e01725-15.
- Bobbarala, V. 2012. *Antimicrobial Agent*. Croatia: InTech.

- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., dan Sessitsch, A. 2014. Metabolic Potential of Endophytic Bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 3(27):30–37.
- Bram, D. 2014. *Politik Hukum Pengelolaan Lingkungan Hidup*. Malang: Setara Press.
- Breed, R. S., Murray, E. G. D., dan Smith, N. R. 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th Edition*. United States of America: The Williams & Wilkins Company.
- Christensen, H., Kuhnert, P., Busse, H. J., Frederiksen, W. C., dan Bisgaard, M. 2007. Proposed Minimal Standards for the Description of Genera, Species and Subspecies of the *Pasteurellaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57: 166-178.
- Davies, J. A., Anderson, G. K., Beveridge, T. J., dan Clark, H. C. 1983. Chemical Mechanism of the Gram Stain and Synthesis of a New Electron-Opaque Marker for Electron Microscopy Which Replaces the Iodine Mordant of the Stain. *Journal of Bacteriology*. 156(2): 837-845.
- Desrini, S. 2015. Resistensi Antibiotik, Akankah Dapat Dikendalikan. *JKKI*. 6(4): 1-3.
- Departemen Agama R. 1994. *Al-qur'an dan Tafsirnya Jilid VI Juz 16-17-12-18*. Jakarta : Depag RI Proyek Pengadaan Kitab Suci Al-qur'an.
- Ditjen POM. 2009. *Materia Medika Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Elita A., Saryono, S., dan Christine, J. 2012. Penentuan Waktu Optimum Produksi Antimikroba dan Uji Fitokimia Ekstrak Kasar Fermentasi Bakteri Endofit *Pseudomonas sp.* dari Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). *J. Ind.Che.Acta*. 3(2): 56-62.
- Gayathri, P., dan Muralikrishnan, V. 2013. Antibacterial Activity of Endophytic Bacteria Isolated from Mangrove Plant. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Science*. 2(4): 530-535.
- Geo, F. B., Karen, C. C., Janet, S. B., dan Stephen. A. M. 2007. *Medical Microbiology*. New York: Mc Graw Hill.
- Geo, F. B., Karen, C. C., Janet, S. B., Stephen. A. M., dan Timothy, A. M. 2013. *Jawetz, Melink & Adelberg's Medical Microbiology, ed. 26*. San Francisco: University of California.
- Glucu-Ustundag, O., dan Mazza, G. 2007. Saponin, Properties, Application and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 47: 231-258.

- Godstime, O. C., Felix, E. O., Augustina, J. O., dan Christopher, E. O. 2014. Mechanisms of Antimicrobial Actions of Phytochemicals Against Enteric Pathogens – A Review. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. 2(2): 77-85.
- Gouda, S., Das, Gitishree., Sen, S. K., dan Patra, J. K. 2016. Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. *Frontiers in Microbiology*. 7(1538): 1-8.
- Hadioetomo RS. 1985. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta : Gramedia.
- Hidayat, Nur. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Andi.
- Hidayati, Nurul. 2010. Isolasi dan Identifikasi Jamur Endofit Pada Umbi Bawang Putih (*Allium sativum*) Sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*. *Skripsi*. Malang: Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hogg, Stuart. 2005. *Essential Microbiology*. United Kindome: John Wiley & Sons, Ltd.
- Imawati, Rohana. 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhizza*) Sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis*. *J-Biol*. 2(1): 1-9.
- Jauhari, Lendra Tantowi. 2010. Seleksi dan identifikasi kapang endofit penghasil antimikroba penghambat pertumbuhan mikroba patogen. *Skripsi*. Jakarta: Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Kader, A., Parvin, S., Chowduri, A, U., dan Haque, E. 2012. Antibacterial, Antifungal and Insecticidal Activities of *Ruellia tuberosa* (L) Root Extract. *J.Bio-sci*. 3(20): 91-97.
- Knaysi, G. 1948. *The Endospore of Bacteria, The Laboratory of Bacteriology State College of Agriculture Vol 12*. Ithaca New York : Cornell University.
- Kozuka, SS., dan Tochikubo, K. 1991. Permeability of Dormant Spore of *Bacillus subtilis* to Methylene Green and Crystal Violet. *Journal of General Microbiology*. 137: 607-613.
- Kumar, A., Singh, R., Yadav, A., Giri, D. D., Singh, P. K., dan Pandey, K. D. 2016. Isolation and Characterization of Bacterial Endophytes of *Curcuma longa* L. *Biotech*. 6(60): 1-8.

- Kumar, S., dan Pandey, A. K. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavanoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. 2013: 1-16.
- Kusari, S., Singh, S., dan Jayabaskaran, C. 2014. Biotechnological Potential of Plant-Associated Endophytic Fungi: Hope Versus Hype. *Trends in Biotechnology*. 32(6): 297-303.
- Lamb, T. G., Tonkyn, D. W., dan Kluepfel, D. A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* From The Rhizosphere to Aerial Plant Tissue. *Journal Microbiol*. 3535(42): 1112-1120.
- Lay, B. W. 1994. *Analisis mikroba di laboratorium*. Jakarta: PT. Gradindo persada.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Edward, R. B., Moore., Taghavi, S., Mezgeay, M., dan Lelie, D. V. D. Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 21(16): 583-606.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., dan Clark, D. P. 2012. *Brock Biology of Microorganisms 13th Edition*. Boston: Pearson Education Inch.
- McKenney PT, Driks A, Eichenberger P. 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol*. 11: 33-44.
- Mesa, J., Naranjo, E., Caviedes, A. M., Gomez, R. S., Pajuelo, E., dan Liorente, D. I. 2015. Endophytic Cultivable Bacteria of the Metal Bioaccumulator *Spartina maritima* Improve Plant Growth but not Metal Uptake in Polluted Marshes Soils. *Fronteirs in microbiology*. 6:1450.
- Mishra, M., dan Chauhan, P. 2016. Application of Microscopy in Bacteriology. *Microscopy Reasearch*. 4: 1-9.
- Mujeeb, F., Bajpai, P., dan Pathak, N. 2014. Phytochemical Evaluation, Antimicrobial Activity, and Determination of Bioactive Components from Leaves of *Aegle marmelos*. *BioMed Research International*. 2014: 1-11.
- Noviana, H. 2004. Pola Kepekaan Antibiotika *Escherichia coli* yang Diisolasi Dari Berbagai Spesimen Klinis. *Jurnal Kedokteran Trisakti*. 4(23):122-126.
- Nurmala., Virgiandhy, IGN., Andriani., dan Liana, D. F. 2015. Resistensi dan Sensitivitas Bakteri terhadap Antibiotik di RSUD dr. Soedarso Pontianak Tahun 2011-2013. *eJKI*. 3(1): 21-28.

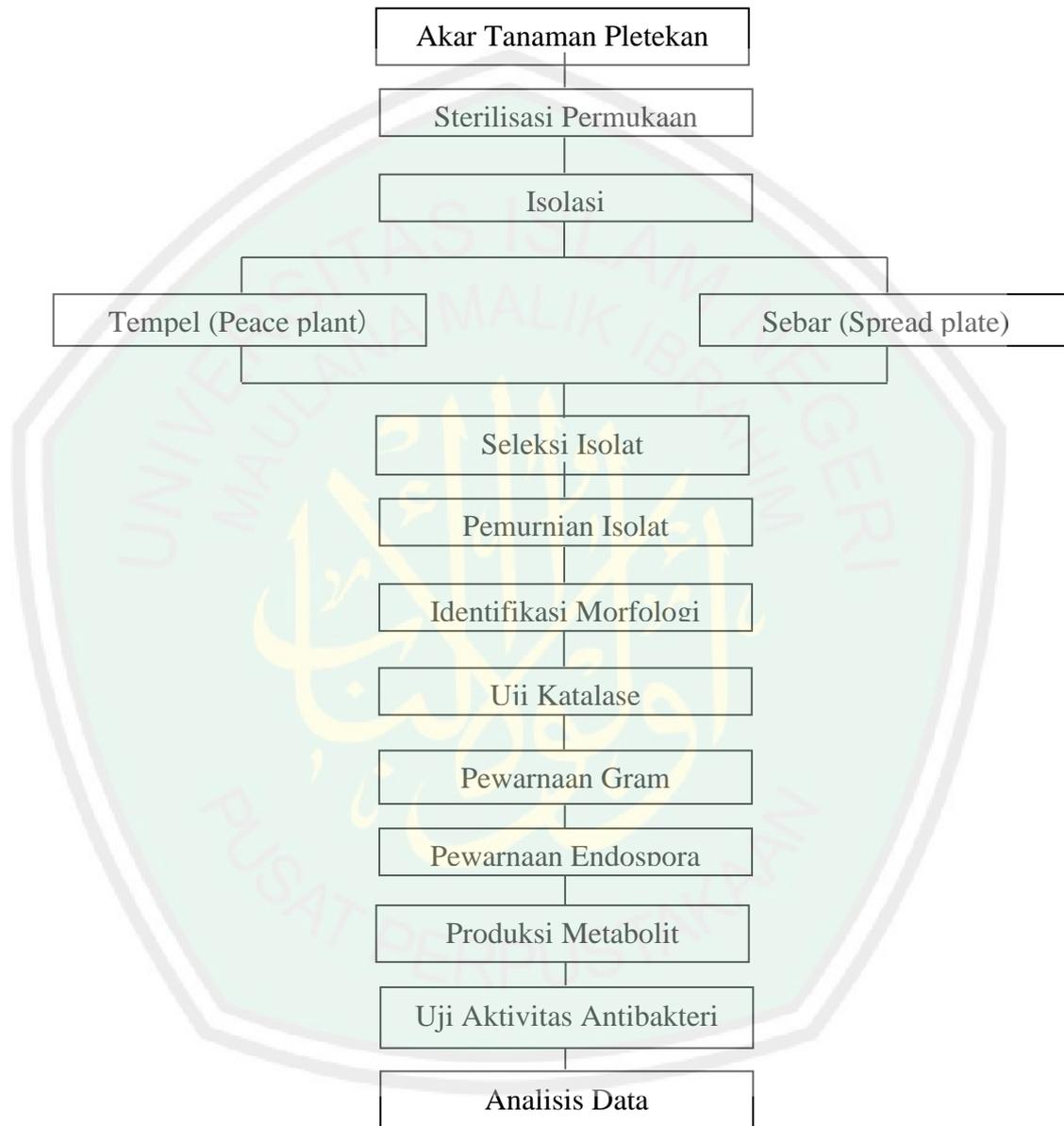
- Nursulistyarini, Fenni. 2014. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Endofit Penghasil Antibakteri Dari Daun Tanaman Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten.) Steenis). *Skripsi*. Yogyakarta: Program Study Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga.
- Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., dan Zhao, Z. 2009. The Acid, Bile Tolerance and Antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Journal of Food Control*. 20(598).
- Pelczar, M. J., dan E, C. S. Chan. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Penerjemah Hadi Oetomo, R. S, dan Tjitrosomo, S. L. Jakarta: UI Jakarta.
- Pimentel, M. R., Molina, G., Dionisio, A. P., Marostica, M. R., dan Pastore, G. M. 2011. Review Article: The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application In Biotransformation Process. *Biotech Journal*. 10(2011): 1–11.
- Purwanto, U. M. S., Pasaribu, F. H., dan Bintang, M. 2014. Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Sirih Hijau (*Piper belte* L) dan Potensinya sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri. *Current Biochemistry*. 1(1): 51-57.
- Purwestri, Y. A., Kartikasari, N., Putri, S. G., Wilson, W., dan Sembiring, L. 2016. Metabolic Profiling of Endophytic Bacteria from Purwoceng (*Pimpinella pruatjan molkend*) Root and Antibacterial Activity Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *American Institute of Physics*. 1744: 1-7.
- Pramudianto, E., dan Evaria. 2012. *MIMS Indonesia Petunjuk Konsultasi Edisi 12*. Singapore: UBM Medica Asia Pte Ltd.
- Pratiwi, S. T. (2008). *Mikrobiologi Farmasi*. Yogyakarta: Penerbit Erlangga.
- Prescott, H. 2002. *Laboratory Exercise in Microbiology Fifth Edition*. New York: The McGraw-Hill Companies.
- Qardhawi, Y. 1998. *Ibadah Dalam Islam. Cet 1*. Surabaya: Bina Ilmu.
- Rhatod, J. R. 2003. *Text Book of Bacteriology*.
- Ryan R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., dan Dowling, D. N. 2007. Minireview: Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol*. 1(278):1–9.
- Safitri, R. 2010. *Medium Analisis Mikroorganisme (Isolasi dan Kultur)*. Jakarta: Trans InfoMedia.
- Salle, A. J. 1943. *Fundamental Principles of Bacteriology*. New York dan London: McGraw-Hill Book Company, Inc.

- Sarker, S. D., dan Nahar, L. 2007. *Kimia untuk Mahasiswa Farmasi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Shahwar, D., Ullah, S., Ahmad, M., Ullah, S., Ahmad, N., dan Khan, M. A. 2011. Hypoglycemic Activity of *Ruellia tuberosa* Linn (Acanthaceae) in Normal and Alloxan Induced Diabetic Rabbits. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences Spring*. 7(2): 107-115.
- Sivakumar, N, Selvakumar, G., Varalakshmi, P., dan Ashokkumar, B. 2014. *Lactobacillus SP*. A Potent Probiotic fro Disease Free Shrimp Aquaculture. *International Journal of Recent Scientific Research*. 5(6): 1031-1045.
- Strobel, G., dan Daisy, B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol Mol Biol Rev*. 67(4): 491–502.
- Strohl, W., Rouse, A. H., dan Fiser, B. D. 2001. *Lippincott's Illustrated reviews : Microbiology*. USA: Lippincott William & wilkins.
- Sukiman, H., dan Nuriyanah. 2016. Potensi Bakteri Endofit dari Tanaman Keladi Tikus Sebagai Penghasil Zat Antimikroba dan Antioksidan. *Biopropal Industri*. 7(1): 27-34.
- Sulistiyani, Ardyati, T., dan Winarsih, S. 2016. Antibacterial and Antioxidant Activity of Endophyte Bacteria Associated with *Curcuma longa* Rhizome. *J.Exp. Life Sci*. 6(1):45-51.
- Suryani, L., dan Stepriyani, S. 2007. Daya Antibakteri Infusa Daun Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa*) Terhadap *Staphylococcus Aureus* dan *Eschericia Coli*. *Mutiara Medika*. 7(1): 23-28.
- Thaslimmunisha, T., Bharathidsan, R., dan Prince, L. 2016. Endophytic Fungi Mediated Silver Nanoparticle as Effective of Antibacterial Agents. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 4(4): 76-82.
- Tim Mikrobiologi. 2003. *Bakteriologi Medik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya*. Malang: Bayumedia Publishing.
- Todar, kenneth. 2012. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. (Online), (http://textbookofbacteriology.net/Bacillus_2.html), diakses 07 Januari 2018.
- Tortora, G., Fince, B. R. dan Case, C. L. 2001. *Introduction Microbiology Edisi 7*. San Francisco spanyol : Addisiom weasly angman.
- Umsl. 2008. *Staining Bacteria*. www.umsl.edu/~microbes/pdf/stainingbacteria.pdf. Diakses pada tanggal 25 Januari 2017.

- Utami, U. 2005. *Isolasi Bakteri Endofit Penghasil Antimikroba Dari Tanaman Rhizopora Musronata*. Malang: Uin Press.
- Vasantharaj, S., Senthilkumar, S., dan Hemashenpagam, N. 2013. Antimicrobial Potential and Screening of Antimicrobial Compounds of *Ruellia tuberosa* L. Using GC-MS. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 4(5): 1815-1819.
- Veterinary Bacteriology and Mycology VPM 201. 2011. *Laboratory handbook*. Canada: Atlantic Veterinary College.
- Volk, W. A., dan Wheeler, M. F. 1988. *Mikrobiologi dasar*. Jakarta : Erlangga.
- Walpajri, F., Rohyani., dan Umayah, S. 2014. Mikroba Endofit “Si Pembunuh” *Escherichia coli*. *Jurnal Biologi*. 2(1): 1-7.
- Waluyo, Lud. 2008. *Teknik Metode Dasar Mikrobiologi*. Malang: UMM press.
- WHO. 2014. *Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance*. Switzerland: WHO Press.
- Wiley, J. M., Sherwood, L. M., dan Woolverton, C. J. 2014. *Prescott's Microbiology 9th Edition*. New York: The McGraw-Hill Companies.

Lampiran 1

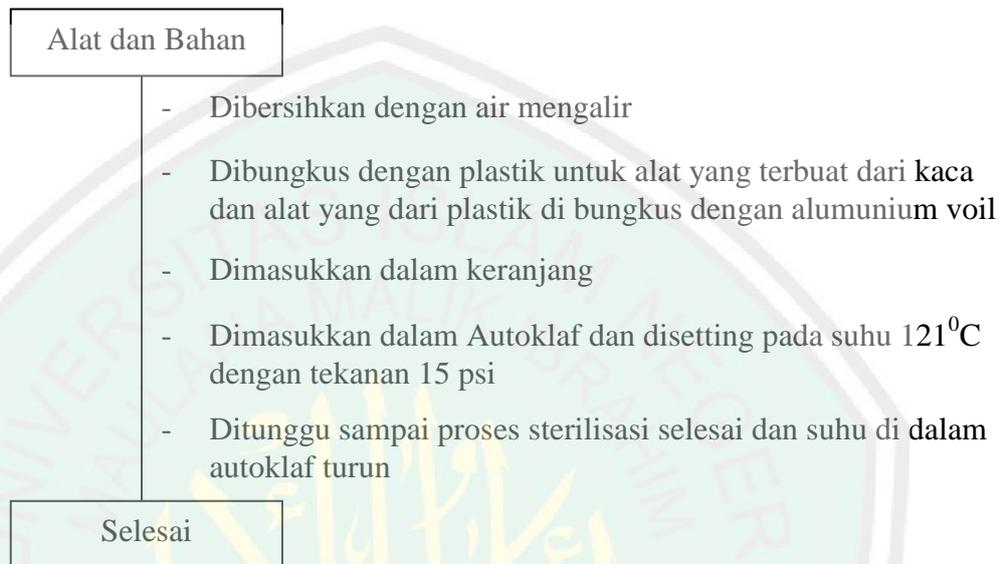
RANCANGAN PENELITIAN



Lampiran 2

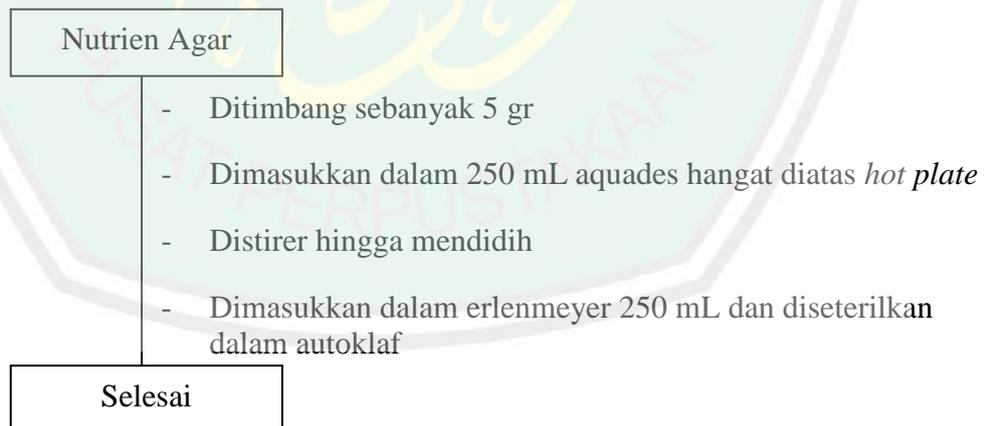
DIAGRAM ALIR

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

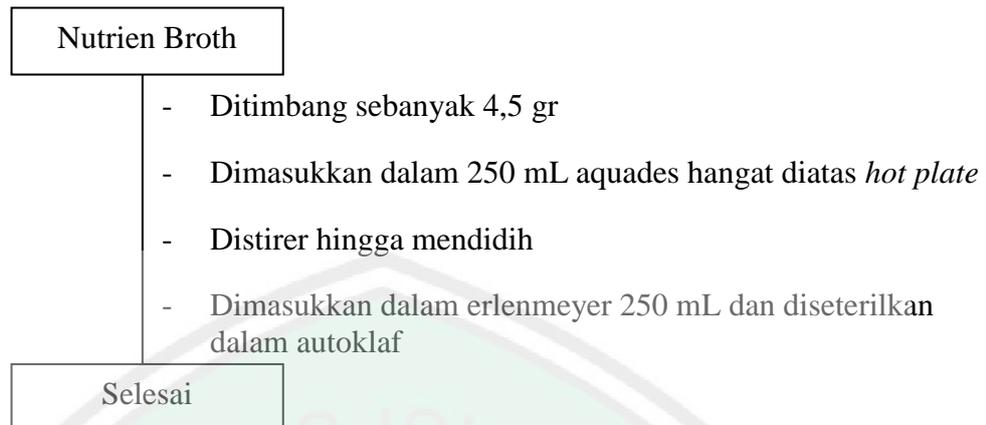


3.5.2 Pembuatan Media (Safitri, 2010)

1.5.2.1 Pembuatan Media NA (*Nutrien Agar*)

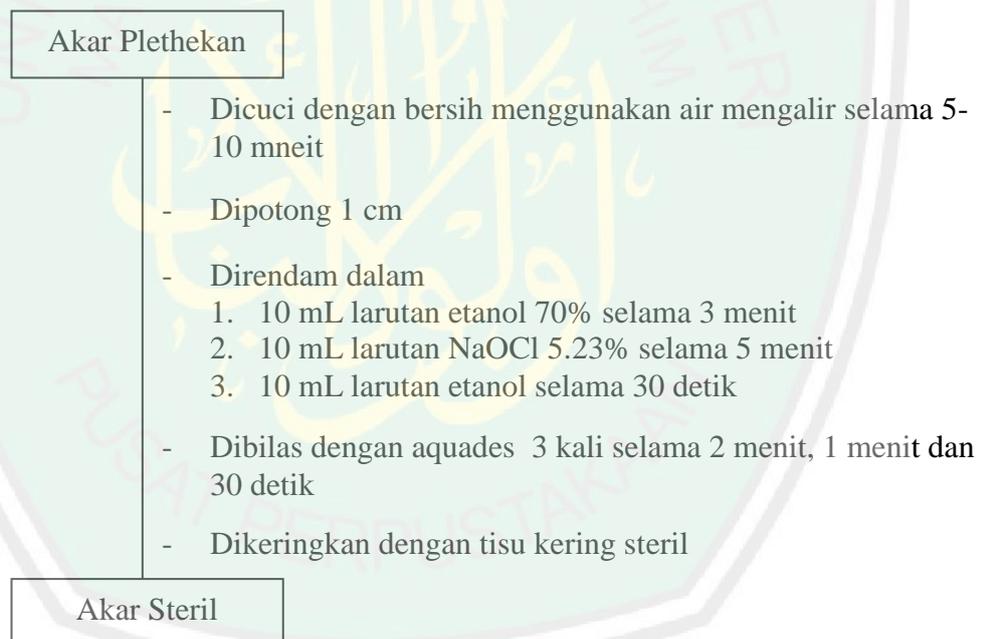


1.5.2.2 Pembuatan Media NB (Nutrien Broth)

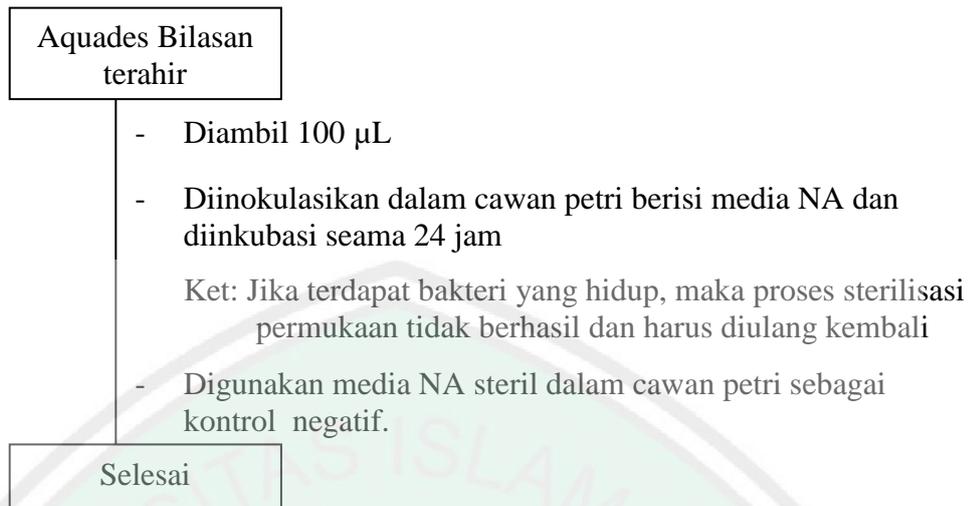


1.5.3 Isolasi Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletekan (Kumar, dkk., 2016)

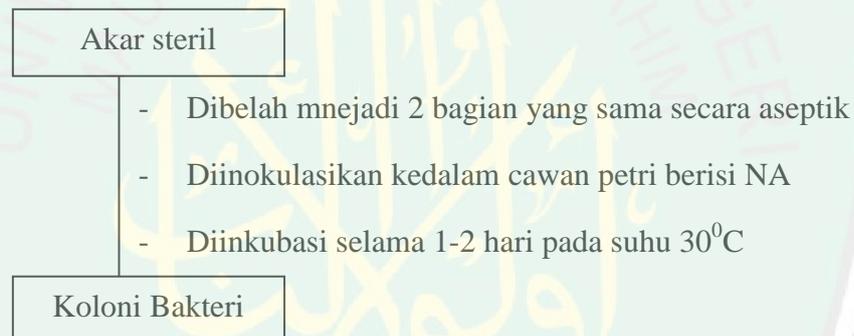
Sterilisasi Permukaan



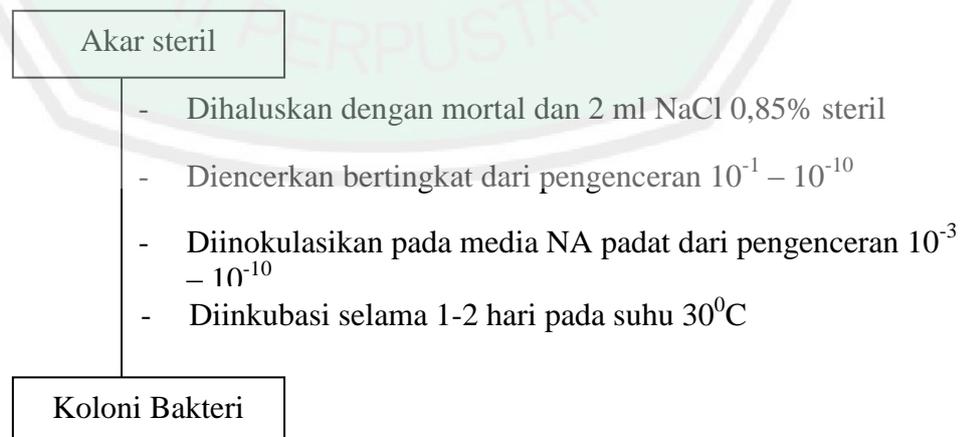
Uji Efisiensi Sterilisasi Permukaan



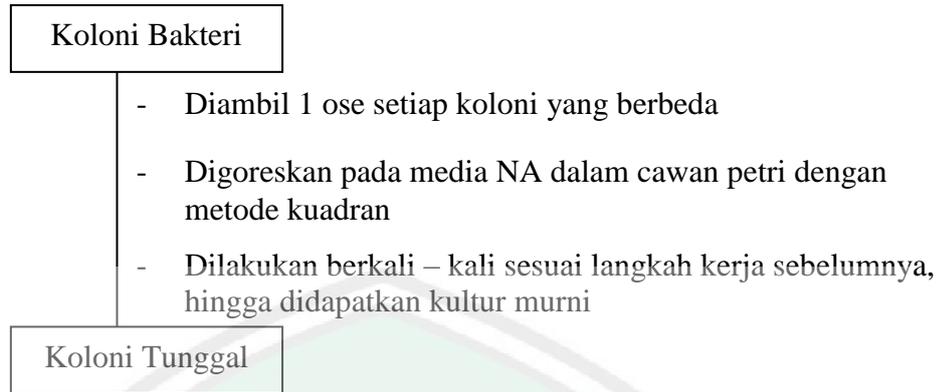
Isolasi Metode Tempel (*peace plant*)



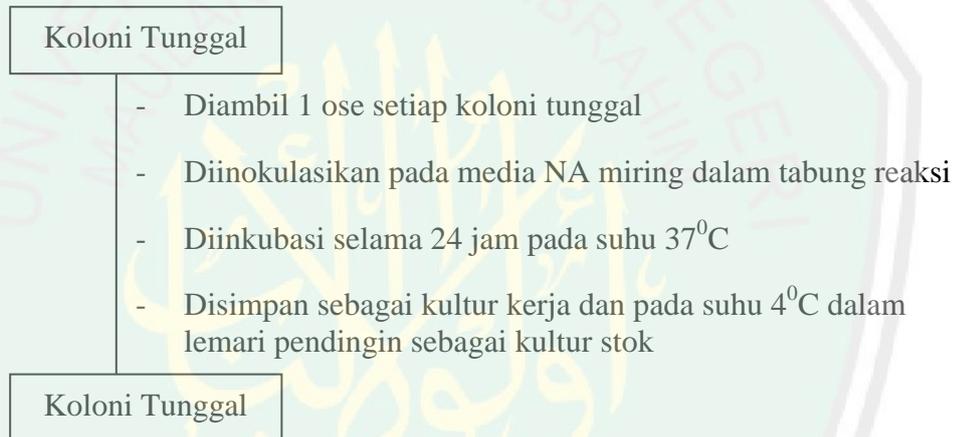
Isolasi Metode Sebar (*spread plate*)



1.5.4 Pemurnian Isolat Bakteri Endofit (Nursulistyarini dan Ainy, 2013)



1.5.5 Pembuatan Inokulum (Listiandiani, 2011)



1.5.6 Identifikasi

2. Pewarnaan Gram (Hadioetomo, 1985)

Koloni Tunggal

- Diambil 1 ose setiap koloni tunggal disuspensikan dengan aquades diatas gelas objek
- Difikasasi diatas api bunsen sampai kering
- Ditetesi dengan kristal ungu dan didiamkan selama 1 menit
- Dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan
- Ditetesi dengan larutan iodin dan didiamkan selama 1 menit
- Dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan
- Ditetesi dengan aklohol 96% sampai warna ungu hilang
- Ditetesi dengan larutan safranin dan didiamkan selama 30 detik
- Dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan
- Diamati dibawah mikroskop

Ket: Gram + mempertahankan warna ungu
Gram – mempertahankan warna merah

Hasil

3. Uji Katalase (Pratiwi, 2008)

Koloni Tunggal

- Diambil 1 ose setiap koloni tunggal disuspensikan dengan aquades diatas gelas objek
- Ditetesi dengan larutan H₂O₂ 3%
- Diamati pembentukan gelembung udara

Koloni Tunggal

4. Pewarnaan Endospora (Lay, 1994)

Koloni Tunggal

- Diambil 1 ose setiap koloni tunggal disuspensikan dengan aquades diatas gelas objek dan diratakan dengan *cover glass* hingga tipis
- Difikasasi diatas api bunsen selma 5 detik
- Ditetesi dengan larutan *Malachit green*
- Dipanaskan diatas api bunsen selama 60 detik

Ket: Jika apusan kering maka ditetaskan dengan larutan *Malachit green*

- Dicuci dengan aquades
- Ditetesi dengan larutan safranin dan didiamkan selama 60 detik
- Dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan
- Diamati dibawah mikroskop

Ket: Sel vegetatif berwarna merah muda
Sel spora berwarna hijau

Hasil

4.5.2 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Endofit (Pratiwi, 2015)

Koloni Tunggal

- Diambil 1 ose setiap koloni tunggal dari media NA miring
- Diinokulasikan pada media NB
- Diukur absorbansi awal NB steril pada λ 600 nm sebagai kontrol
- Diukur absorbansi NB berisi bakteri pada λ 600 nm pada menit ke-0 (t_0)
- Dishaker dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 37°C selama mencapai fase stasioner akhir
- Diukur absorbansi pada λ 600 nm setiap interval 2 jam

Ket: Kurva pertumbuhan diakhiri pada fase stasioner akhir

Hasil

4.5.3 Produksi Metabolit Sekunder Bakteri Endofit (Sukiman dan Nuriyana, 2016)

Koloni Tunggal

- Diambil 1 ose setiap koloni tunggal dari media NA miring
- Di inokulasikan pada 10 mL media NB
- Dishaker sesuai dengan hasil metode 3.5.7
- Diambil 3% dari hasil inokulasi diinokulasikan kembali pada 100 mL NB
- Dishaker sesuai dengan hasil metode 3.5.7
- Disentrifuge selama 10 menit pada 10.000 rpm
- Diambil filtrat sebagai ekstrak kasar metabolit sekunder

Hasil

4.5.4 Uji Aktivitas Antibakteri Termodifikasi (Sukiman dan Nuriyanah, 2016)

Ekstrak Metabolit Sekunder

- Diambil sebanyak 50 μ l
- Dibuat kertas cakram steril dengan diameter 6 mm
- Direndam didalam larutan ekstrak selama 30 menit
- Diambil dan diletakkan kertas cakram mengandung ekstrak kasar metabolit sekunder diatas medium uji aktivitas
- Diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37⁰C

Hasil



Lampiran 3

KOMPOSISI MEDIA

Komposisi Bahan

1. Medium Nutrien Agar (NA)

- Beef extract	3 g
- Bacto pepton	5 g
- Agar	15 g
- Aquadest	1000 ml

2. Medium Nutrien Broth (NB)

- Beef extract	3 g
- Bacto pepton	5 g
- Aquadest	1000 ml

3. Kristal Ungu (1%)

- Kristal violet (85% kandunga dye)	1 g
- Aquadest	. 100 ml

4. Larutan Iodin

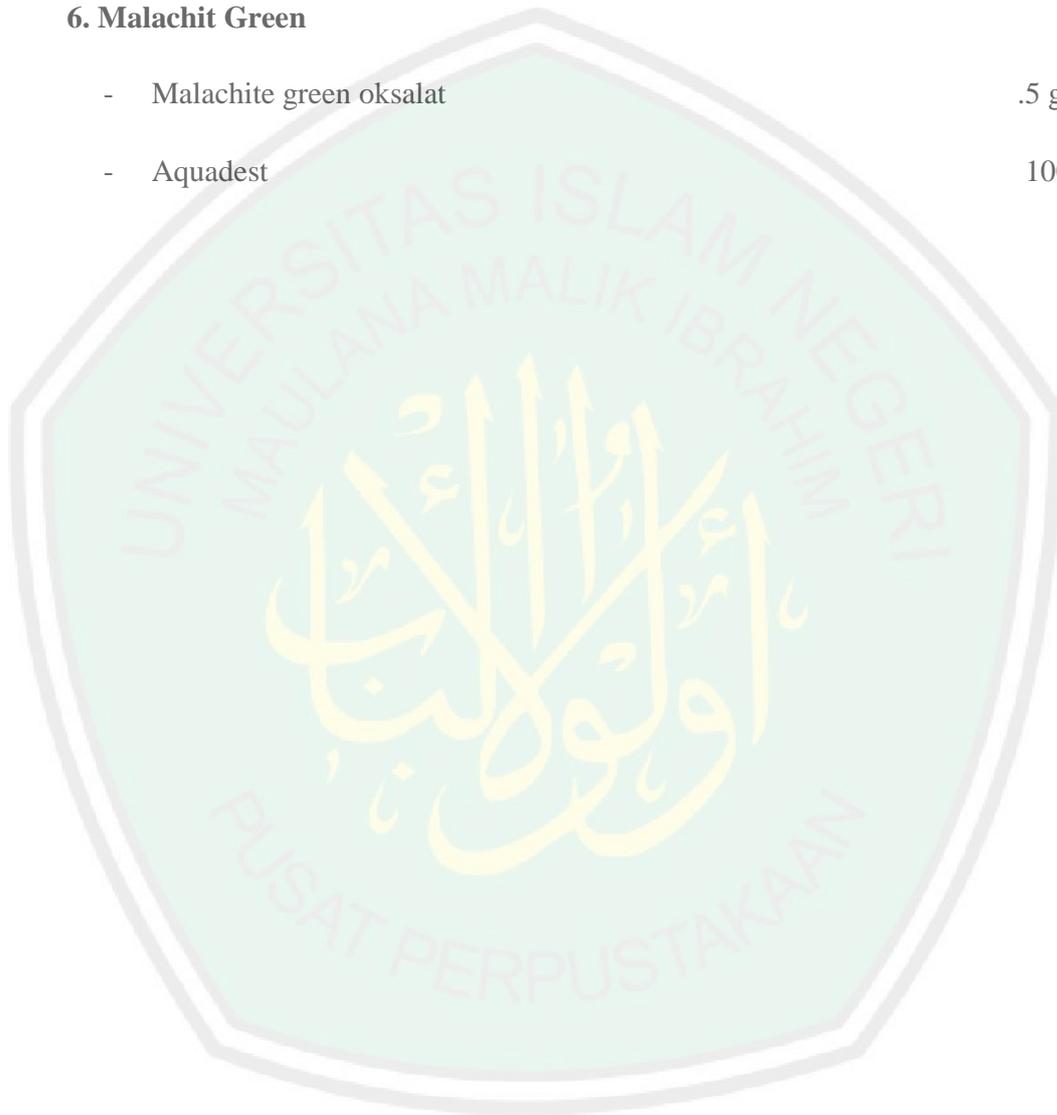
- Kristal iodin	1 g
- Potassium iodida	. 2 g
- Aquadest	300 ml

5. Larutan Safranin

- Safranin 2.5 g
- 95% ethyl alkohol 100 ml

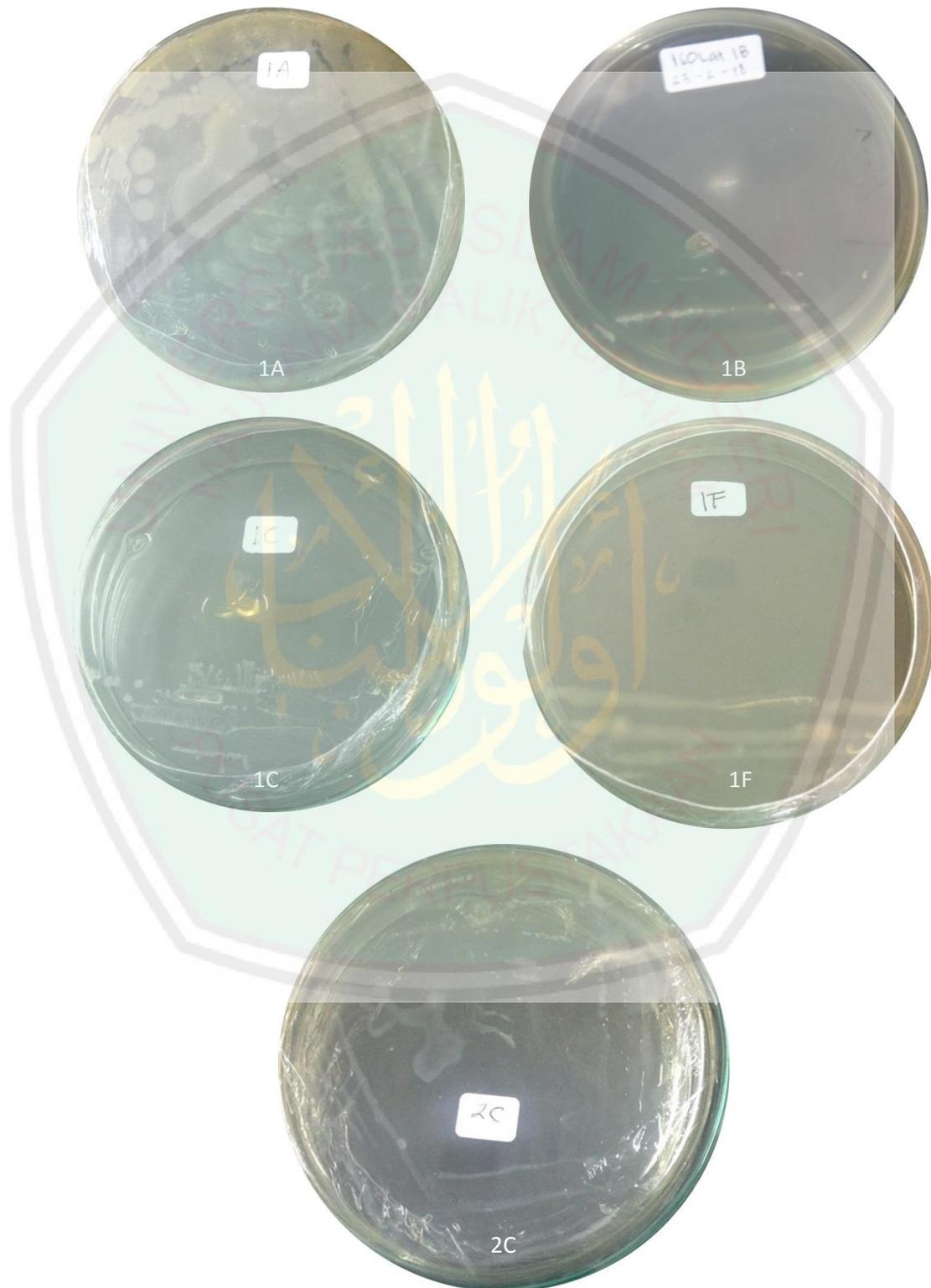
6. Malachit Green

- Malachite green oksalat .5 g
- Aquadest 100 ml



Lampiran 4

Hasil Isolasi
Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletekan



Lampiran 5

Hasil Uji Katalase

Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletekan



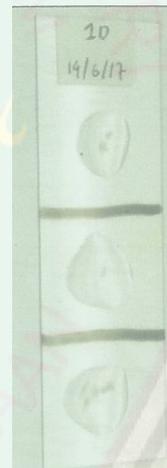
Isolat 1A
Positif Katalase ++



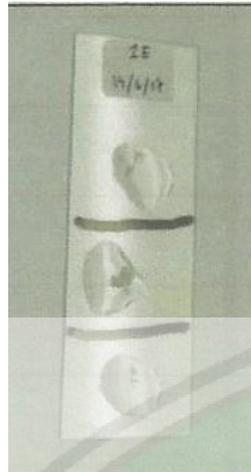
Isolat 1B
Positif Katalase +++



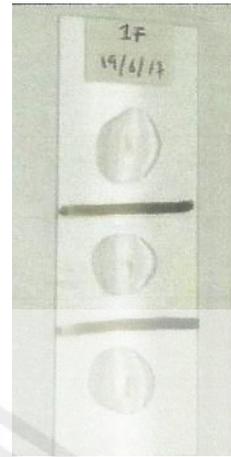
Isolat 1C
Positif Katalase ++



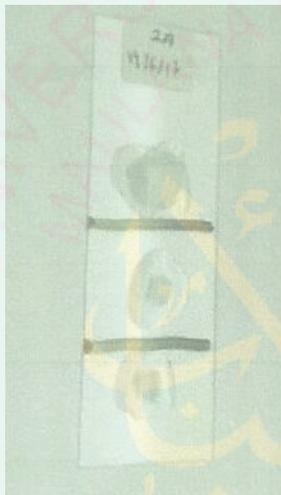
Isolat 1D
Positif Katalase +



Isolat 1E
Positif Katalase +



Isolat 1F
Negatif Katalase -



Isolat 2A
Positif Katalase +++



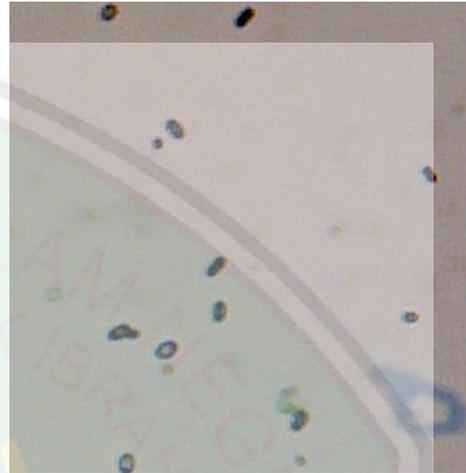
Isolat 2B
Positif Katalase +++



Isolat 2C
Positif Katalase ++

Lampiran 6**Hasil Pewarnaan Endospora
Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletekan**

Isolat 1A
Positif Endospora



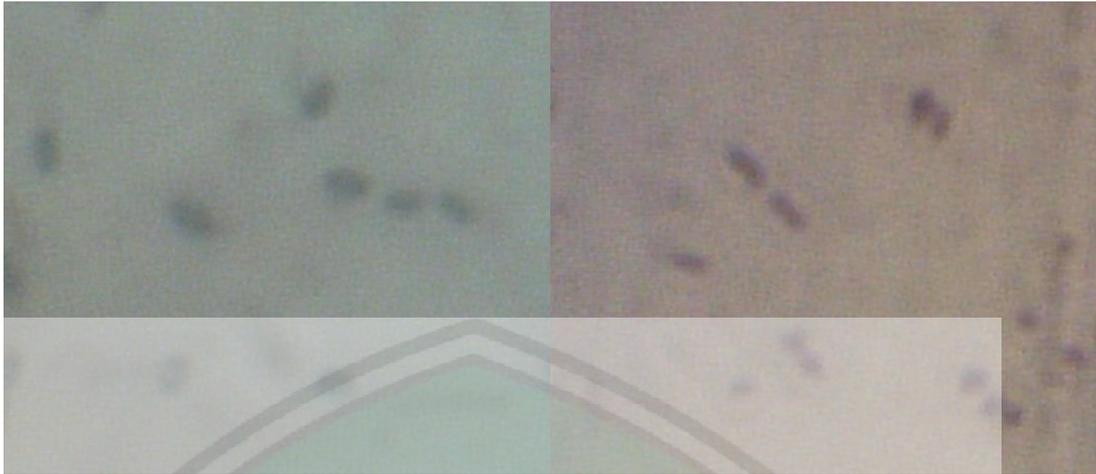
Isolat 1B
Positif Endospora



Isolat 1C
Negatif Endospora

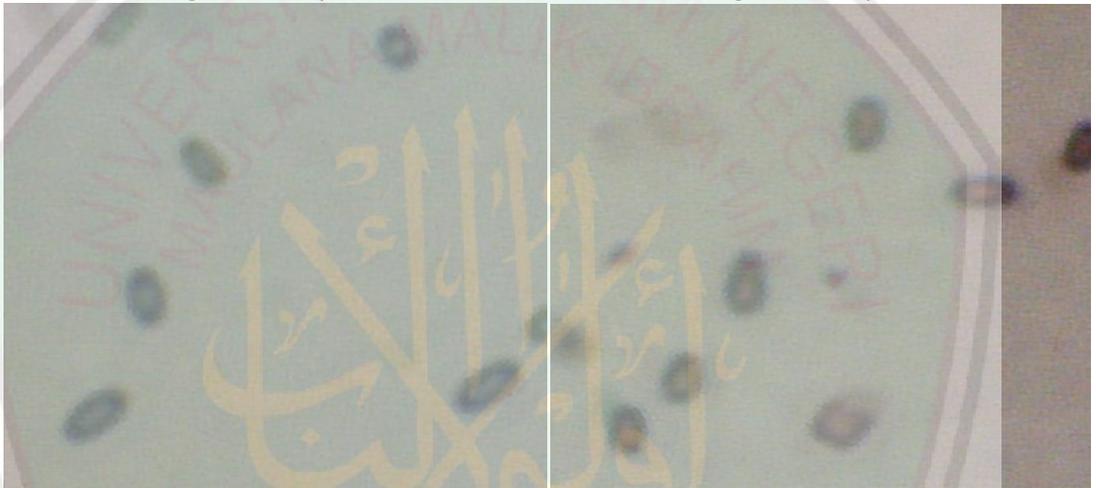


Isolat 1D
Positif Endospora



Isolat 1E
Negatif Endospora

Isolat 1F
Negatif Endospora



Isolat 2A
Positif Endospora

Isolat 2B
Positif Endospora



Isolat 2C
Positif Endospora

Lampiran 7

**Nilai Optical Density (OD) Kurva Pertumbuhan
Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletekan**

Jam	Nilai Optical Density (OD)								
	Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletekan								
	1A	1B	1C	1D	1E	1F	2A	2B	2C
0	0,2018	0,0257	0,0221	0,012	0,012	0,0067	0,0067	0,0144	0,0112
2	0,2233	0,0954	0,1342	0,028	0,028	0,0462	0,0462	0,0147	0,05661
4	0,0844	0,177	0,1867	0,0619	0,0619	0,3505	0,3505	0,0304	0,8023
6	0,8192	0,4814	0,2436	0,0613	0,0613	0,6485	0,6485	0,1397	1,3897
8	0,9489	0,6053	0,3259	0,182	0,182	1,005	1,005	0,3535	1,5231
10	1,2842	0,705	0,379	0,2826	0,2826	1,1557	1,1557	0,465	1,6169
12	1,3612	0,7106	0,4574	0,5007	0,5007	1,3612	1,3612	0,582	1,7553
14	1,4499	0,2221	0,5455	0,3427	0,3427	1,4499	1,4499	0,6901	1,3746
16	1,6169	0,3299	0,6875	0,49	0,49	1,6169	1,6169	0,8198	1,9239
18	1,7349	0,586	0,7698	0,6125	0,6125	1,7349	1,7349	0,8722	1,9647
20	1,7084	0,5509	1,0699	0,685	0,685	1,7384	1,7384	0,4071	1,9854
22	1,7168		1,0672	0,719	0,719	1,7536	1,7536	0,7028	1,9744
24	1,6353		1,0609	0,8001	0,8001	1,7779	1,7779	0,8094	1,9601
26	1,6641		1,1894	0,5752	0,5752	1,8796	1,8796	0,9124	1,9494
28			1,1499	0,7474	0,7474			0,9553	1,9861
30			1,2548					1,004	1,5329
32			1,1624					1,0405	1,628
34			1,2456					1,0215	1,6089
36			1,332					1,0905	
40			1,3808						
44			1,3895						
48									
52									

Lampiran 8

Hasil TPC Bakteri Uji

1. Bakteri *Eschericia coli*

No	Komposisi (Media NB : Inokulum) ml	Absorbansi
1	5,75 : 0,25	0,2697
2	5,5 : 0,5	0,4501
3	5,25 : 0,75	0,6536
4	5 : 1	0,8009

Hasil TPC

Faktor Pengenceran	Jumlah Bakteri Hitung			
	1	2	3	4
10 ⁻⁵	TBUD	TBUD	SP	SP
10 ⁻⁶	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
10 ⁻⁷	78	85	22	269
10 ⁻⁸	5	9	25	61
10 ⁻⁹	1	2	21	8
10 ⁻¹⁰	0	0	8	2

Perhitungan jumlah bakteri

- Komposisi yang dipilih = komposisi 1

$$\text{Jumlah bakteri} = \text{Bakteri hitung} \times \frac{1}{Fp}$$

$$\text{Jumlah bakteri} = 78 \times \frac{1}{10^{-7}}$$

$$\text{Jumlah bakteri} = 7,8 \times 10^8 \text{ cfu}$$

2. Bakteri *Staphylococcus aureus*

No	Komposisi (Media NB : Inokulum) ml	Absorbansi
1	5,75 : 0,25	0,1991
2	5,5 : 0,5	0,3731
3	5,25 : 0,75	0,5752
4	5 : 1	0,7658

Hasil TPC

Pengenceran	Jumlah Bakteri Hitung			
	1	2	3	4
10^{-3}	SP	SP	SP	SP
10^{-4}	TBUD	SP	SP	TBUD
10^{-5}	347	TBUD	TBUD	TBUD
10^{-6}	279	116	157	225
10^{-7}	125	26	355	51
10^{-8}	60	2	60	5
10^{-9}	74	0	15	1
10^{-10}	12	0	9	0

Perhitungan jumlah koloni

- Komposisi yang dipilih = komposisi 1

$$\text{Jumlah bakteri} = \text{Bakteri hitung} \times \frac{1}{Fp}$$

$$\text{Jumlah bakteri} = 279 \times \frac{1}{10^{-6}}$$

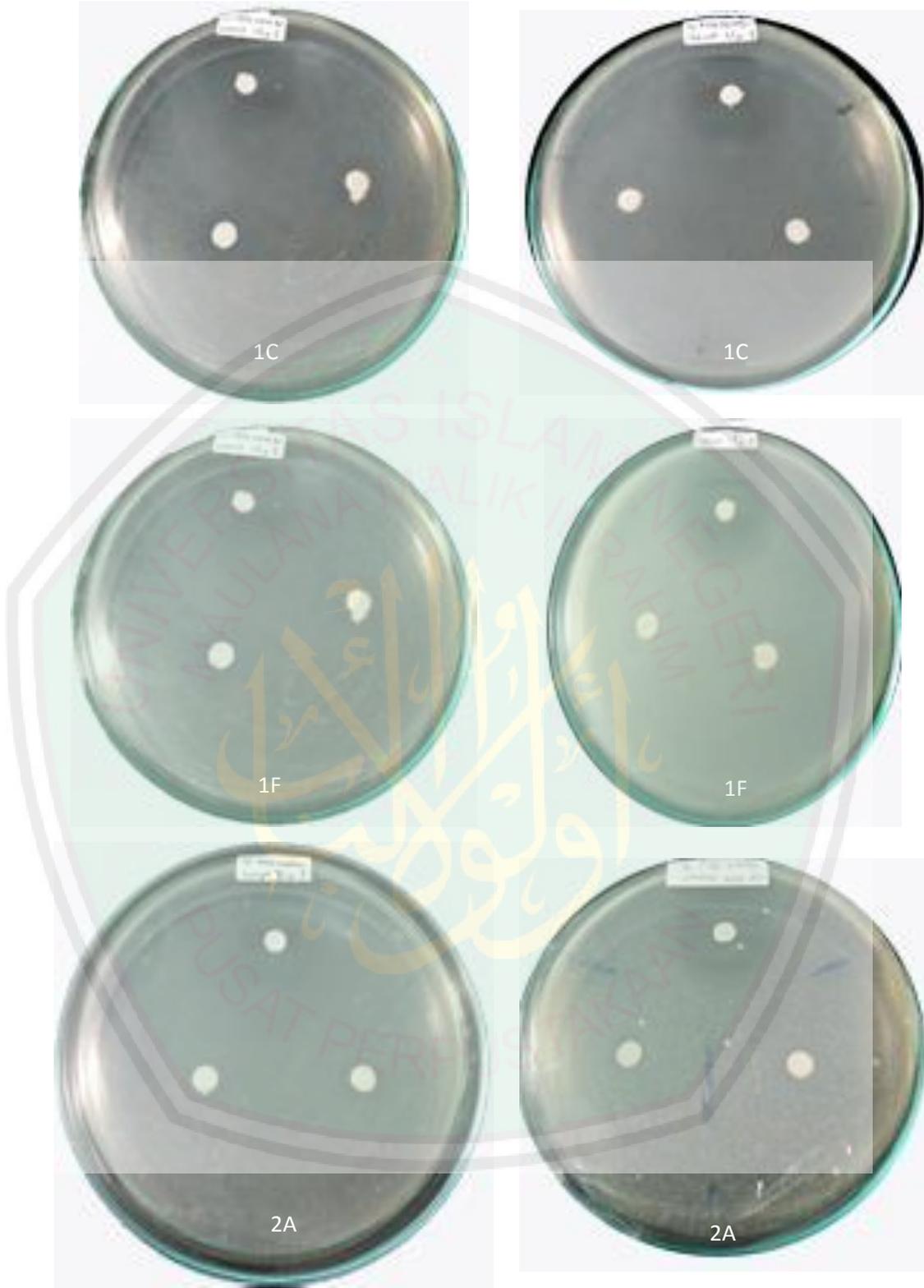
$$\text{Jumlah bakteri} = 2,79 \times 10^8 \text{ cfu}$$

Lampiran 9

Hasil Uji Aktivitas Antibakteri
Ekstrak Kasar Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman Pletekan

<i>Eschericia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
------------------------	------------------------------







KEMENTERIAN AGAMA RI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MALIKI MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN KIMIA

Gedung Sains dan Teknologi UIN Malang Lt.2 Jl. Gajayana 50 Malang Telp./Fax +62341558933
www.uin-malang.ac.id Email: info@uin-malang.ac.id, kimia@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI PENELITIAN

Nama : ZIKA ATQIYAH IRAMAQHAN
NIM : 13630109
Judul Skripsi : ISOIASI BAKTERI ENDOFIT DARI AKAR TANAMAN PLETHEKAN (Ruellia tuberosa L) DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI
Pembimbing Utama : ANIK MAUNATIN, M.P.
Pembimbing Agama : ANIK ATQIYAH, M.Si
Konsultansi : AKYUNUL JANNAT, S.Si, M.P.

No	Tanggal	Materi Konsultasi	Catatan (ditulis tangan)	Tanda tangan (Pembimbing)
1	29/12/2016	Judul		
2	23/12/2016	BAB I Rev		
3	10/01/2017	BAB I Revisi		
4	13/01/2017	BAB II		
5	16/01/2017	BAB II Revisi		
		BAB III		
		BAB III Revisi		
6	17/02/2017	1 "	Acc. prop	
7	18/01/2017	BAB I		
8	25/01/2017	BAB I Revisi		
9	7/02/2017	BAB III		
10	15/02/2017	BAB III Revisi		
11	17/02/2017	"	Acc prop	
12	10/11/2017	Kontrolasi Data		
13	21/11/2017	Revisi bab 9		
14	09/12/2017	Revisi bab 9		
15	15/12/2017	"	Acc Kompre	
16	19/12/2017	"	Acc Kompre	
17	23/01/2018	Perbaiki lampiran	"	
18	23/01/2018		Acc Skripsi	