

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Komposisi Medium

#### 1. *Medium Nutrient Agar* (NA) (Juariah dan Sari, 2018)

✓ Beef extract	3 g
✓ Bacto pepton	5 g
✓ Agar	15 g
✓ Akuades	1000 ml

#### 2. *Mannitol Salt Agar* (MSA) (Naibaho, 2019)

✓ Powder	1 g
✓ Pepton	10 g
✓ Sodium chloride	75 g
✓ Mannitol	10 g
✓ Phenol red	0,025 g
✓ Agar	15 g
✓ Akuades	1000 ml

#### 3. *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Melani, 2020)

✓ Beef extract	300 g
✓ Casamino acids	17,5 g
✓ Starch	1,5 g
✓ Agar	17 g
✓ Akuades	1000 ml

#### 4. *Brain Heart Infusion* (BHI) (Diana, 2018)

✓ Caft Brain Infusion Padat	12,5 g
✓ Beef Heart Infusion Padat	5 g
✓ Protease Pepton	10 g
✓ Glukosa	2 g
✓ Sodium Chloride	5 g

- ✓ Di-sodium Phosphate                      2,5 g
- ✓ Akuades    1000 ml

**5. *Kliger's Iron Agar (KIA) (Tankeshwar, 2019)***

- ✓ Beef extract                      3 g
- ✓ Ekstrak ragi                      3 g
- ✓ pepton                              15 g
- ✓ Proteose peptone                5 g
- ✓ Laktosa                            10 g
- ✓ Glukosa                            1 g
- ✓ Ferrous sulfate                  0,2 g
- ✓ Natrium klorida                  5 g
- ✓ Natrium tiosulfat                0,3 g
- ✓ Agar                                12 g
- ✓ Phenol red                        0,024 g
- ✓ Akuades                            1000 ml
- ✓ pH                                    7,4

**6. *Lysine Iron Agar (LIA) (Diana, 2018)***

- ✓ Pepton                              5 g
- ✓ Ekstrak khamir                    3 g
- ✓ Dekstrosa                        1 g
- ✓ Lysine                                10 g
- ✓ Ferric Ammonium Citrat        0,5 g
- ✓ Natrium tiosulfat                0,04 g
- ✓ Brom cresol purple              0,02 g
- ✓ Agar                                15 g
- ✓ Akuades                            1000 ml

**7. *Sulfida Indol Motility (SIM) (Kurniawati, 2012)***

- ✓ Peptone from casein            20 g
- ✓ Peptone from meat              6,6 g

- ✓ Amonium iron (III) citrat 0,2 g
- ✓ Natrium tiosulfat 0,2 g
- ✓ Agar 3 g
- ✓ Akuades 1000 ml

**8. Media gula-gula (Melani, 2020)**

- ✓ Ekstrak daging 3 g
- ✓ Pepton 5 g
- ✓ *Phenol red* 1% 1 ml
- ✓ Akuades 1000 ml
- ✓ Karbohidrat (gula) 5 g

**9. *Simmons Citrate Agar* (SCA) (Kurniawati, 2012)**

- ✓ Ammonium dihydrogen fospat 1 g
- ✓ di-Potassium hydrogen fospat 1 g
- ✓ Natrium klorida 5 g
- ✓ Natrium citrate 2 g
- ✓ Magnesium sulfat 0,2 g
- ✓ Bromothymol blue 0,08 g
- ✓ Agar 13 g
- ✓ Akuades 1000 ml

**Lampiran 2. Pembuatan Medium**

**1. Medium *Natrium Agar* (NA) (Juariah dan Sari, 2018)**

- ✓ Menyiapkan bahan yang terdiri dari beef ekstrak 3 g, bacto pepton 5 g, agar 15 g, dan akuades 1000 ml.
- ✓ Memasukkan semua bahan tersebut ke dalam labu erlenmeyer larutkan dengan akuades 1000 ml kemudian dipanaskan menggunakan *hotplate* dan diaduk sampai homogen menggunakan batang pengaduk.
- ✓ Campuran media disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit guna menghindari pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diinginkan.

- ✓ Setelah sterilisasi, media dimasukkan ke dalam cawan petri steril sebanyak 20 ml dan tabung reaksi steril yang diletakkan pada posisi miring  $\pm 45^{\circ}$  sebanyak 5 ml.
- ✓ Membiarkan media hingga memadat dengan sempurna.
- ✓ Membiarkan media tersebut selama 24 jam sebelum digunakan.

## 2. *Mannitol Salt Agar (MSA)* (Naibaho, 2019)

- ✓ *Mannitol Salt Agar (MSA)* merupakan media selektif dan media diferensial. Penanaman dilakukan dengan cara satu ose biakan diambil.
- ✓ Menimbang media MSA sebanyak 38 g/l.
- ✓ Memasukkan kedalam Erlenmeyer, campurkan dengan akuades sebanyak 1000 ml.
- ✓ Panaskan sampai mendidih sambil diaduk-diaduk
- ✓ Angkat dan tutup Erlenmeyer dengan kapas, lapisi dengan kertas perkamen kemudian ikat dengan benang.
- ✓ Sterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit
- ✓ Setelah setril, angkat dari autoklaf dengan perlahan-lahan dan hati-hati. Dinginkan sejenak.
- ✓ Dinginkan sebentar, buka kertas perkamen yang diikatkan pada Erlenmeyer, kemudian tuangkan kedalam cawan petri secara aseptis.

## 3. *Mueller Hinton Agar (MHA)* (Melani, 2020)

- ✓ Menyiapkan bahan yang terdiri dari beef ekstrak 300 g, casamino acids 17,5 g, starch 1,5 g, agar 17 g, Akuades 1000 ml.
- ✓ Memasukkan semua bahan tersebut ke dalam labu erlenmeyer larutkan dengan akuades 1000 ml kemudian dipanaskan menggunakan *hotplate* dan diaduk sampai homogen menggunakan batang pengaduk.
- ✓ Campuran media disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit guna menghindari pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diinginkan.

- ✓ Menuang media ke cawan petri steril sebanyak 20 ml dan dibiarkan hingga memadat.

**4. *Brain Heart Infussion (BHI) (Arifin, 2016).***

- ✓ Sebanyak 37 gram serbuk BHI dilarutkan dalam 1 liter akuades.
- ✓ Memanaskan bahan hingga larut dan homogen.
- ✓ Memasukkan media ke dalam erlenmeyer kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.
- ✓ Media disimpan di dalam lemari es.

**5. *Kliger's Iron Agar (KIA) (Tankeshwar, 2019)***

- ✓ Menyiapkan semua bahan.
- ✓ Melarutkan semua bahan dengan akuades.
- ✓ Memanaskan bahan sambil diaduk rata sampai terlarut sempurna.
- ✓ Memasukkan media ke dalam tabung sebanyak 6 ml kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.
- ✓ Media dibiarkan memadat dalam posisi miring dimana bagian miring merupakan seluruh permukaan yang terpapar oksigen atmosfer bersifat aerobic dan bagian dalam bersifat anaerobic.

**6. *Lysine Iron Agar (LIA) (Diana, 2018)***

- ✓ Menyiapkan semua bahan.
- ✓ Melarutkan bahan menggunakan akuades sebanyak 1000 ml.
- ✓ Memanaskan bahan sambil diaduk rata sampai terlarut sempurna.
- ✓ Memasukkan media ke dalam tabung reaksi kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.
- ✓ Media dibiarkan memadat dalam posisi miring.

**7. *Sulfida Indol Motility (SIM) (Kurniawati, 2012).***

- ✓ Menyiapkan 30 gram *Sulfida Indol Motility (SIM)*.
- ✓ Melarutkan bahan menggunakan akuades sebanyak 1000 ml.
- ✓ Mendidihkan menggunakan *hot plate* dan dihomogenkan.

- ✓ Memasukkan media ke dalam tabung reaksi kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.
- ✓ Media dibiarkan memadat dalam posisi miring.

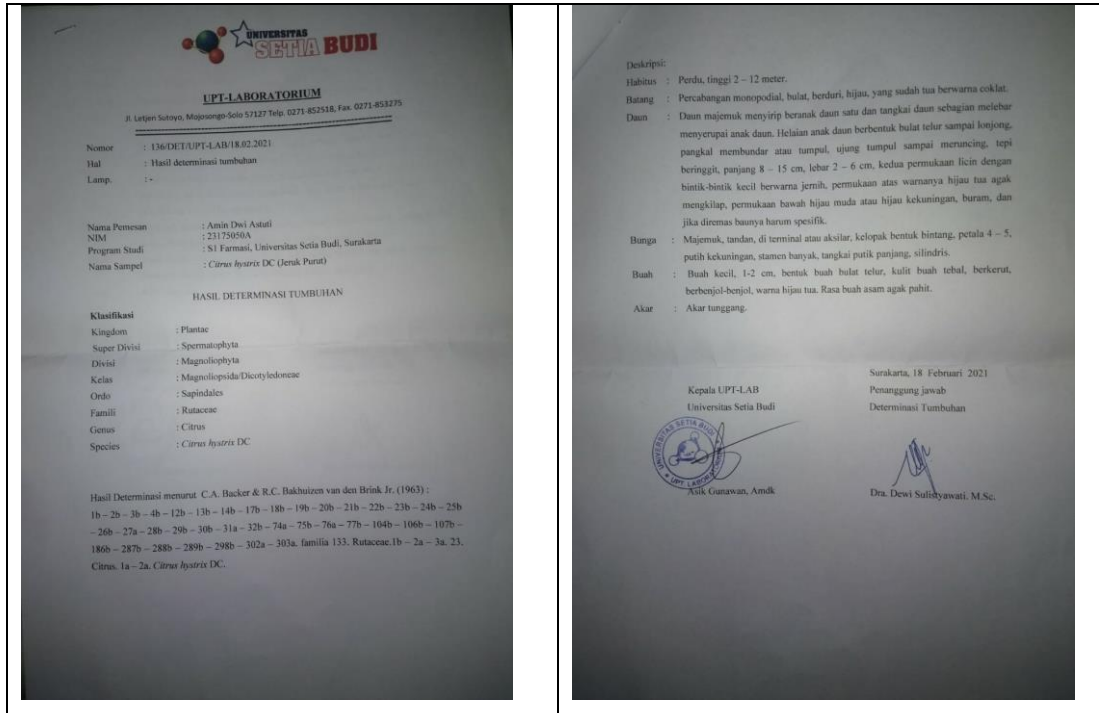
**8. Media gula-gula (Melani, 2020)**

- ✓ Menyiapkan 3 g ekstrak daging, 5 g pepton, 1 ml *phenol red* 1%.
- ✓ Melarutkan bahan menggunakan akuades sebanyak 1000 ml sampai homogeny.
- ✓ Menambahkan 5 g/l masing-masing gula ke dalam media yang telah homogen.
- ✓ Media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.

**9. *Simmons Citrate Agar* (SCA) (Kurniawati, 2012).**

- ✓ Menyiapkan 22,5 gram *Simmons Citrate Agar* (SCA).
- ✓ Melarutkan bahan menggunakan akuades sebanyak 1000 ml.
- ✓ Mendidihkan menggunakan *hot plate* dan dihomogenkan.
- ✓ Memasukkan media ke dalam tabung reaksi kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.
- ✓ Media dibiarkan memadat dalam posisi miring.

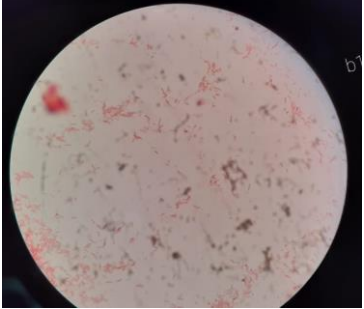
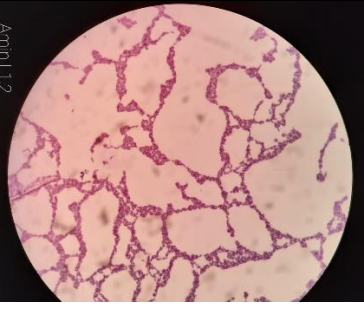

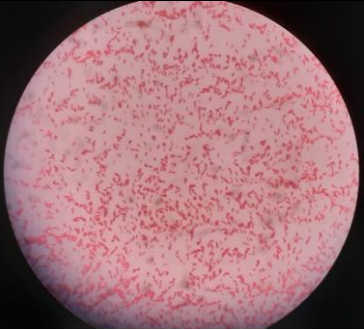
### Lampiran 3. Hasil Determinasi



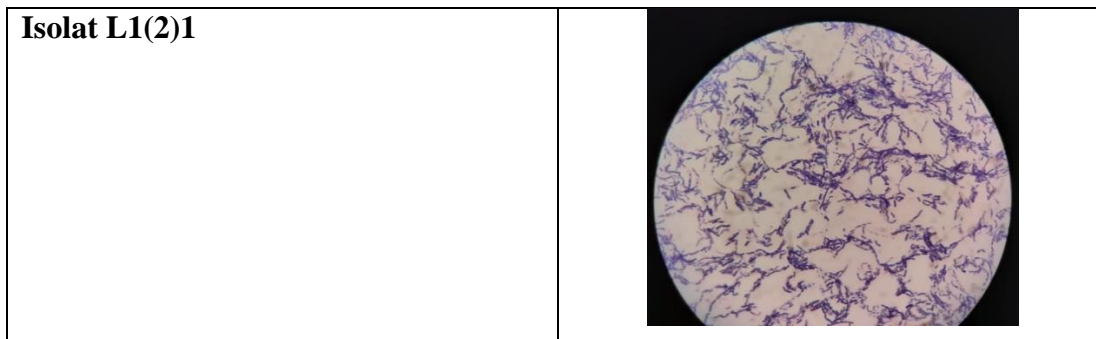
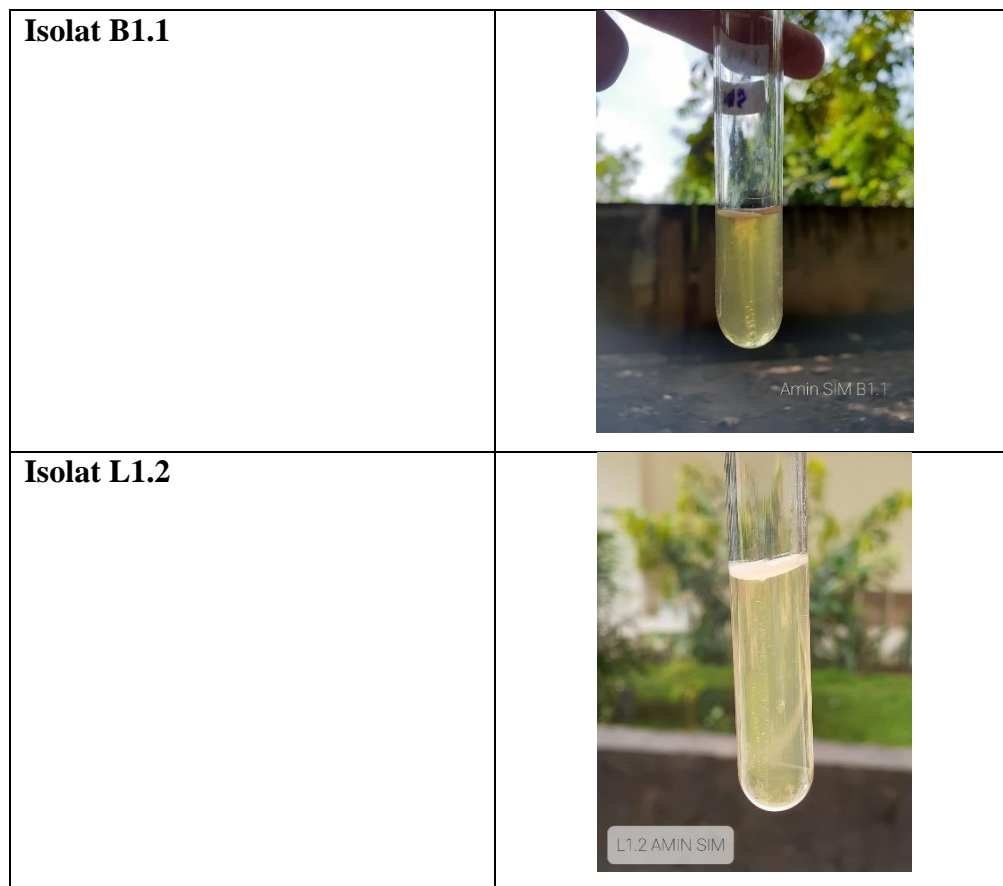
### Lampiran 4. Pemurnian Bakteri Endofit



**Lampiran 5. Hasil Pewarnaan Gram Bakteri Endofit**




<b>Isolat B1.1</b>	
<b>Isolat L1.2</b>	
<b>Isolat B1(2)3</b>	
<b>Isolat B2(2)2</b>	



**Lampiran 6. Hasil Uji Biokimia Bakteri Endofit****1. SIM**

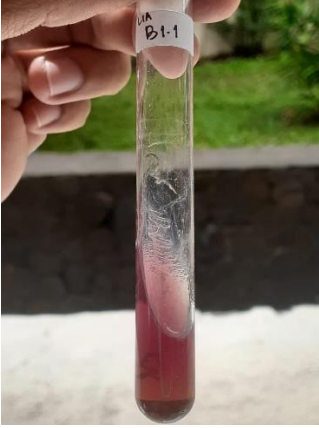

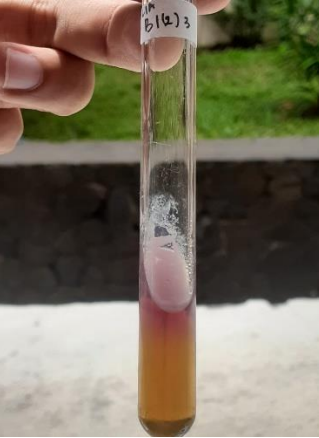
**Isolat B1(2)3****Isolat B2(2)2****Isolat L1(2)1**

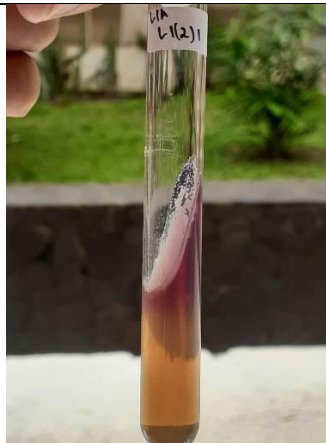
**2. KIA**

<b>Isolat B1.1</b>	 <p>Amin KIA B1.1</p>
<b>Isolat L1.2</b>	 <p>L1.2 KIA</p>
<b>Isolat B1(2)3</b>	 <p>B1(2)3 KIA AMIN</p>




**Isolat B2(2)2****Isolat L1(2)1**



**3. LIA**

<b>Isolat B1.1</b>	
<b>Isolat L1.2</b>	
<b>Isolat B1(2)3</b>	

**Isolat B2(2)2****Isolat L1(2)1**

**4. Citrat**





<b>Isolat B1.1</b>	
<b>Isolat L1.2</b>	
<b>Isolat B1(2)3</b>	

<b>Isolat B2(2)2</b>	
<b>Isolat L1(2)1</b>	


## 5. Katalase

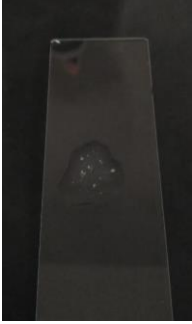
<b>Isolat B1.1</b>	
--------------------	---









<b>Isolat L1.2</b>	
<b>Isolat B1(2)3</b>	
<b>Isolat B2(2)2</b>	
<b>Isolat L1(2)1</b>	


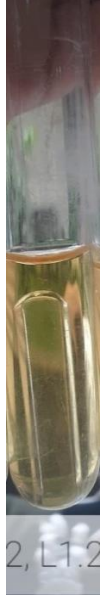










**6. Koagulase**













<b>Isolat B1.1</b>	
<b>Isolat L1.2</b>	
<b>Isolat B1(2)3</b>	
<b>Isolat B2(2)2</b>	

<b>Isolat L1(2)1</b>	
----------------------	---

### 7. Fermentasi Gula

<b>Kode Isolat</b>	<b>Sukrosa</b>	<b>Laktosa</b>	<b>Mannitol</b>	<b>Galaktosa</b>	<b>Fruktosa</b>	<b>Glukosa</b>
<b>B1.1</b>						

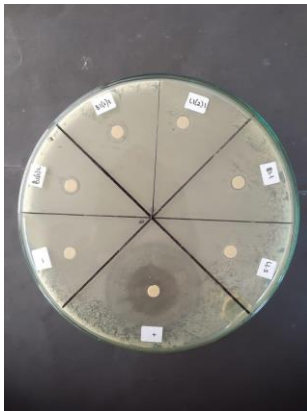
<b>L1.2</b>	 <p>3, L1.2</p>	 <p>2, L1.2</p>	 <p>L1.2</p>	 <p>L1.2</p>	 <p>sa, L1.</p>	 <p>a, L1.2</p>
<b>B1(2)3</b>	 <p>B1(2)3</p>	 <p>, B1(2)</p>	 <p>B1(2)3</p>	 <p>L1(2)3</p>	 <p>B1(2)3</p>	 <p>, B1(2)3</p>

<b>B2(2)2</b>			 B2(2)2,	 B2(2)2	 B2(2)2	 a, B2(2)
<b>L1(2)1</b>	 a L1(2)1	 L1(2)1	 L1(2)1,	 (2)1, B	 L1(2)1	 2, L1(2)

### Lampiran 7. Supernatan Bakteri Endofit



### Lampiran 8. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri



### Lampiran 9. Data SPSS

#### ✓ Uji Normalitas

#### Tests of Normality

	isolate_bakteri_endofit	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
diameter_zona_bening	kontrol positif	.419	4	.	.688	4	.008
	kontrol negatif	.214	4	.	.963	4	.798
	B1.1	.326	4	.	.802	4	.106
	L1.2	.192	4	.	.975	4	.875
	B1(2)3	.250	4	.	.894	4	.402
	B2(2)2	.154	4	.	.999	4	.997
	L1(2)1	.250	4	.	.917	4	.519

a. Lilliefors Significance Correction

Interpretasi hasil: terdapat data yang memiliki nilai sig <0,05 data tidak terdistribusi normal, pengujian dilanjutkan dengan uji non parametric kruskal wallis.

✓ Uji Kruskal Wallis

		Ranks	
	isolate_bakteri_endo fit	N	Mean Rank
diameter_zona_benin	kontrol positif	4	26.50
g	kontrol negatif	4	0.00
	B1.1	4	15.63
	L1.2	4	13.25
	B1(2)3	4	14.25
	B2(2)2	4	17.25
	L1(2)1	4	12.13
	Total	28	

Test Statistics<sup>a,b</sup>

diameter_zon a_bening	
Kruskal-Wallis	17.981
H	
df	6
Asymp. Sig.	.006

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

isolate\_bakteri\_endofit

Interpretasi hasil: nilai sig <0,05 terdapat perbedaan yang signifikan antar masing-masing kelompok isolat bakteri endofit daun jeruk purut.

✓ Uji Post Hoc Duncan

diameter\_zona\_bening

Duncan<sup>a</sup>

isolate_bakteri_endof it	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
kontrol negatif	4	.000		
L1(2)1	4		9.5500	
L1.2	4		9.6250	
B1(2)3	4		9.7625	

B1.1	4		9.8250	
B2(2)2	4		10.1375	
kontrol positif	4			26.2750
Sig.		1.000	.735	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Interpretasi hasil: isolat bakteri endofit mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, karena mampu menghasilkan diameter zona hambat yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif, diameter zona hambat belum sama dengan kontrol positif karena isolate yang dihasilkan masih belum murni.