

LAPORAN PENELITIAN

Judul Penelitian :

**Optimasi Kondisi Fermentasi Pada Produksi Metabolit
Antibakteri Dari Bacillus Tequilensis BSMF Simbiotil
Halichonhondria Panicea**



umsurabaya
Morality, Intellectuality, and Entrepreneurship
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURABAYA

**Fakultas
Ilmu Kesehatan**

Oleh :

**Dr. apt. Isnaeni, M.S (NIDK: 8983050022)
Hilman Kasyfil Isyarfi (20211666037)
Yuliansyah Nurista (20201666026)**

**FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURABAYA**

Jl. Sutorejo No. 59 Surabaya 60113
Telp. 031-3811966

<http://www.um-surabaya.ac.id>

Tahun 2021-2022

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Optimasi Kondisi Fermentasi Pada Produksi Metabolit Antibakteri Dari Bacillus Tequilensis BSMF Simbiotik Halichonhondria Panicea

Skema :

Jumlah Dana : Rp. 10.000.000,00

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Dr. Apt. Isnaeni, M.S

b. NIDN : 8983050022

c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala

d. Program Studi : S1 Farmasi

e. No Hp : 085213225797

f. Alamat Email : isnaeni@um-surabaya.ac.id

Anggota Mahasiswa (1)

a. Nama Lengkap : Hilman Kasyfil Isyafi

b. NIM : 20211666037

c. Perguruan Tinggi : Universitas Muhammadiyah Surabaya

Anggota Mahasiswa (2)

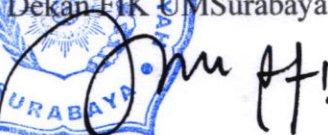
a. Nama Lengkap : Yuliansyah Nurista

b. NIM : 20201666026

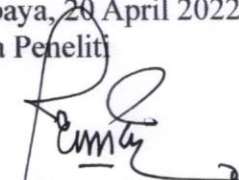
c. Perguruan Tinggi : Universitas Muhammadiyah Surabaya



Mengetahui
Dekan FHK UMSurabaya


Dr. Nur Mukarromah, SKM., M.Kes
NIDN. 0713067202

Surabaya, 20 April 2022
Ketua Peneliti


Dr. Apt. Isnaeni, M.S
NIDN. 8983050022



Menyetujui
Ketua LPPM UMSurabaya


Dede Nasrullah, S.Kep., Ns., M.Kep
NIDN. 0730016501

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Meningkatnya bakteri patogen yang resisten terhadap antibakteri saat ini berbanding lurus pula dengan kebutuhan akan antibakteri baru. Akibat bakteri yang resisten terhadap efek bakterisidal maupun bakteristatik dari sediaan antibakteri sehingga efektifitasnya menurun (Hasan & Al-Harmoosh, 2020). Jawaban dari persoalan ini yaitu dengan melakukan eksplorasi sumber antibakteri baru dari mikroorganisme. Saat ini, eksplorasi terhadap biota yang berada di daratan masih menjadi pilihan dibandingkan biota laut yang sedang dalam perkembangan (Cuadrat et al., 2020). Metabolit antibakteri yang berasal dari laut berpotensi untuk dikembangkan karena 2/3 bagian wilayah Indonesia merupakan lautan, salah satunya adalah Perairan Madura. Wilayah ini dipilih menjadi daerah penelitian sebab perairan Madura memiliki kualitas perairan yang baik dan biota laut yang beragam diantaranya udang, ikan, dan spons (Santanumurti et al., 2019).

Spons adalah invertebrata yang memiliki kerangka skeleton dan lapisan lunak yang menyerupai jeli. Kerangka skeleton spons tersusun dari silikat, kalsium karbonat, dan protein sedangkan lapisan lunak spons tersusun dari asam lemak, kolagen yang berfungsi sebagai nutrisi bagi makhluk hidup lain (Rajendran, 2019). Oleh karena itu, salah satu mikroorganisme seperti bakteri dapat bersimbiosis dengan spons. Bakteri yang hidup bersimbiosis diketahui dapat memproduksi metabolit antibakteri dengan spektrum yang lebih luas jika dibandingkan dengan bakteri yang hidup bebas sehingga bakteri menjadi target sebagai sumber antibakteri. Selain itu, bakteri tergolong dalam sumber antibakteri yang berkelanjutan karena jumlahnya melimpah dan mudah dalam proses pembiakan.

Sebelumnya telah dilakukan penelitian (Damar, 2019) yang berhasil mengisolasi *Bacillus tequilensis* BSMF yang bersimbiosis dengan *Halichondria panicea* yang berasal dari Perairan Cabbiya Madura sehingga pada penelitian ini akan dilakukan uji apakah isolat tersebut memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* TCC 25923 dan *Eschericia coli* TCC 25922. Pembaruan dari penelitian ini yaitu *B. tequilensis* BSMF diisolasi dari hasil simbiosis dengan spons yang berasal dari perairan Madura. Penelitian terkait uji aktivitas antibakteri *B. tequilensis* telah dilaporkan untuk isolat dari tanah dan air, sedangkan isolat dari spons di Indonesia belum dilaporkan. Aktivitas antimikroba pirolo[1,2-a] pirazin-1,4-dion yang diisolasi dari *B. tequilensis* MSI45 asal laut India telah diuji oleh (Kiran et al., 2018). Sedangkan protease alkali dari *B. tequilensis* ZMS-2 asal tanah

Pakistan sebagai sumber antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* telah dilaporkan oleh (Khan et al., 2019). Antibakteri yang dihasilkan akan dipengaruhi oleh perbedaan karakteristik habitat.

Melalui proses fermentasi akan dihasilkan senyawa metabolit dengan aktivitas antibakteri oleh bakteri. Proses pembentukan metabolit antibakteri akan dipengaruhi oleh stabilitas dari enzim *Non Ribosomal Peptide Synthetase* (NRPS) dan *Polyketide Synthase* (PKS) yang berperan sebagai biokatalisator yang menjembatani proses fermentasi. Kinerja enzim dalam bakteri dan proses fermentasi untuk menghasilkan metabolit antibakteri dapat dipengaruhi oleh faktor fisikokimia lingkungan (Uribe-Lorío et al., 2019). Faktor fisikomia tersebut diantaranya adalah pH media, suhu inkubasi, ketersediaan oksigen, dan waktu inkubasi. Optimasi pH media dan suhu inkubasi pada proses produksi penting dilakukan untuk mendapatkan hasil metabolit antibakteri yang optimum.

Pada penelitian ini, kondisi metabolit antibakteri akan menggunakan *Potato Dextrose Agar* (PDA) sebagai media. Derajat keasaman media PDA akan diatur ke arah basa agar dapat digunakan untuk pertumbuhan bakteri (Yoghiapiscessa et al., 2016). Media PDA dengan pH 5, 6, 7, 8 akan dilakukan inkubasi pada suhu 28°C, 32°C, dan 37°C selama 72 jam sesuai hasil orientasi pada skala laboratorium yang menunjukkan pertumbuhan *B. tequilensis* BSMF optimum pada rentang tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah isolat *Bacillus tequilensis* BSMF simbiotik *Halichondria panicea* dari Perairan Cabbinya Madura memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escheria coli* ATCC 25922?
2. Berapa pH media dan suhu inkubasi yang optimum untuk proses produksi metabolit antibakteri isolat *B. tequilensis* BSMF pada media PDA?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui aktivitas antibakteri isolat *Bacillus tequilensis* BSMF simbiotik *Halichondria panicea* dari Perairan Cabbinya Madura terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escheria coli* ATCC 25922
2. Menentukan pH media dan suhu inkubasi yang optimum untuk proses produksi metabolit antibakteri isolat *B. tequilensis* BSMF pada media PDA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Bacillus tequilensis* BSMF

Kebutuhan antibakteri baru sebelumnya menyebabkan peningkatan patogen yang resistensi terhadap antibakteri. Efek bakterisidal akan tahan terhadap bakteri yang resisten maupun bakteriastik dari persediaan bakteri sehingga efektivitasnya menurun (Hasan & Al-Harmoosh, 2020). Bakteri yang hidup bersimbiosis ditargetkan sebagai sumber antibakteri karena dapat menghasilkan metabolit antibakteri dengan spektrum lebih luas dibandingkan dengan bakteri yang hidup bebas. Selain itu, karena jumlahnya banyak dan mudah berkembang biak, bakteri ini dianggap sebagai sumber antibakteri yang berkelanjutan.

Bacillus tequilensis dipilih karena model pembentukan dan karakterisasi biofilm. Isolatnya ialah bakteri gram positif non patogen, umumnya ditemukan pada madu dan terkenal menghasilkan biofilm. *Bacillus sp.* merupakan strain bakteri model untuk pembentukan biofilm karena ada dua aspek. Pertama, spesies *Bacillus* dapat menghasilkan endospora tahan panas yang berperan penting dalam persistensi bakteri dan pembentukan biofilm. Kedua, anggota genus *Bacillus* diketahui mampu menghasilkan zat polimer ekstraseluler (EPS), yang memainkan peran penting dalam resistensi biofilm terhadap antibiotik dengan menciptakan penghalang mekanis yang membatasi difusi obat ke dalam sel bakteri. Selain itu, bakteri ini juga mempunyai motilitas gerombolan, yang dapat memfasilitasi kelangsungan hidup mikroba di lingkungan dan kolonisasi permukaan, yang mengarah pada pembentukan biofilm.

Produksi biomassa *Bacillus tequilensis* BSMF dibuat dengan menambahkan larutan NaCl 0,9% dan kemudian dibantu mencampurkan bantuan vortex hingga terbentuknya suspensi. Dengan menggunakan mikropipet, 100 μ L suspensi isolat *B. tequilensis* BSMF (transmitan 25% pada panjang gelombang 580 nm) diambil. Jumlah bakteri yang hidup (ALT, jumlah lempeng total) minimal 10⁶cfu/ml dihitung dan dicampur pada 20 mL media PDA yang telah diatur dengan dapar fosfat 0,05 M hingga pH 5, 6, 7, dan 8. Pada Lapisan benih atas, yang berukuran 8 mL, dibuat dari suspensi bakteri uji 3 μ L, termasuk *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 BSM-F. Pengukuran transmisi dilakukan dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 580 nm, yang mencapai 25% transmisi. Transmisi 25% digunakan sesuai dengan persyaratan dalam

Farmakope Indonesia VI karena jumlah bakteri pada transmisi tersebut sekitar 107–109cfu/mL, sehingga bakteri dapat ditumbuhkan pada media dan mencapai fase logaritma (Kemenkes RI, 2020).

Fermentasi yang sudah ditumbuhi biomassa *B. tequilensis* BSMF, kemudian dicongkel memakai silinder pencetak berdiameter 7,50 mm dan diletakkan di atas permukaan media yang sudah diinokulasi dengan bakteri uji. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37 derajat Celcius selama 72 jam dan diamati setiap 24 jam. Zona jernih yang tampak di sekitar agar yang mengandung koloni *B. tequilensis* BSMF diukur menggunakan jangka sorong.

2.2 *Halicha paniecea*

Halichondria (*Halichondria*) *panicea* adalah spesies spons yang termasuk dalam kelas Demospongiae. Spesies ini juga adalah bagian dari genus *Halichondria* dan famili Halichondriidae. Nama ilmiah spesies ini pertama kali diterbitkan pada tahun 1766 oleh Pallas. Seperti spons pada umumnya, spesies ini mempunyai tubuh yang berpori dan permukaan yang keras seperti batu. Selain itu, *Halichondria* (*Halichondria*) *panicea* juga dapat menyerap oksigen dari air melalui proses difusi.



Kerajaan	:	Animalia
Upakerajaan	:	Parazoa
Filum	:	Porifera
Kelas	:	Demospongiae
Ordo	:	Halichondrida
Famili	:	Halichondriidae

Genus : Halichondria
Spesies : Halichondria panicea

Sponga adalah biota laut multiseluler primitif yang berfungsi sebagai filter feeder. Mereka menghisap air dan bahan-bahan lain di sekitarnya melalui pori-pori (ostia / ostium) dan mengalir ke seluruh tubuhnya melalui saluran (canal), dan dikeluarkan melalui pori-pori yang terbuka (ostula / osculum). Sponga termasuk dalam filum porifera, yang berarti hewan laut yang memiliki pori-pori dan saluran. Secara umum, tubuh sponga terdiri dari tiga lapisan: pinacocytes, choanocytes, dan mesohyl. Lapisan di luar sponga adalah pinacocyte. Choanocytes (dari bahasa Yunani, "choane" berarti cerobong, dan "kytos" berarti berongga) adalah lapisan dalam sponga, yang merupakan sel berflagellum (memiliki ekor). Choanocyte inilah yang mengatur masuknya air ke dalam tubuh sponga. Choanocyte memiliki collar, yang merupakan serabut atau rambut, di sekitarnya.

2.3 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC 25923 pada umumnya digunakan sebagai strain kontrol untuk pengujian kerentanan terhadap antibiotik dan sebagai strain kontrol kualitas untuk produk komersial. Kami menyajikan urutan genom lengkap untuk strain tersebut, yang terdiri dari kromosom dan plasmid 27,5 kb.

Staphylococcus aureus merupakan patogen oportunistik yang bisa menyebabkan keracunan makanan, serta berbagai infeksi *Staphylococcus aureus* subsp. aureus ATCC 25923 adalah isolat klinis dengan sebutan Seattle 1945 yang digunakan sebagai strain kontrol pengujian laboratorium standar. Hal ini sensitif terhadap berbagai antibiotik, termasuk methisilin. Isolat tersebut mengandung elemen seperti kromosom kaset stafilokokus (seperti SCC) yang tidak memiliki rekombinasi dan mecA. Penelitian melaporkan genom lengkap isolat tersebut, terdiri dari kromosom 2.778.854-bp dan plasmid 27.491-bp, pS1945.

DNA genom terbuat dari isolat yang dibeli melalui Remel Inc. di bawah lisensi American Type Culture Collection (ATCC), dan perpustakaan sisipan 10-kb diurutkan pada sistem RSII Pacific Biosciences. Perakitan de novo dengan Celera Assembler versi 8.1 dan pemolesan dengan Quiver versi 0.8 menghasilkan satu contig masing-masing untuk kromosom dan plasmid. Cakupan rata-rata untuk contig kromosom adalah 408×, dan cakupan rata-rata untuk contig plasmid adalah 593×.

2.4 *Escherichia coli* ATCC 25922

Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah bakteri patogen yang menyebabkan diare, meningitis, dan infeksi lainnya. Antibiotik adalah pengobatan umum untuk penyakit infeksi, tetapi penggunaan yang tidak tepat menyebabkan resistensi terhadap antibiotik. Dibutuhkan terapi alternatif untuk agen antibakteri yang berasal dari tumbuhan karena kasus resistensi.

Escherichia coli, bakteri Gram-negatif yang kehadirannya ada di mana-mana, terkenal karena kemampuannya menyebabkan wabah yang ditularkan melalui makanan. Strain ATCC 25922 adalah strain kendali mutu yang umum digunakan, khususnya dalam uji sensitivitas antibodi dan awalnya diisolasi dari sampel klinis manusia yang dikumpulkan di Seattle dan WA. Ini adalah serotipe O6 dan biotipe 1. Perakitan genom sebelumnya tersedia untuk umum, namun ada dalam 116 rangkaian.

DNA genom berkualitas tinggi diekstraksi dari isolat yang dimurnikan menggunakan QIAGEN Genome Tip-500 di Divisi Sistem Diagnostik USAMRIID (DSD). Secara khusus, kultur bakteri 100 mL ditumbuhkan ke fase diam dan asam nukleat diekstraksi sesuai rekomendasi pabrik. Data sekuens yang dihasilkan mencakup teknologi Illumina (perpustakaan 100-bp standar tidak berpasangan dengan cakupan genom 300 kali lipat) dan teknologi Roche 454 (sisipan 7.847- ± 1.962-bp, cakupan genom 32 kali lipat). Data dari dua perpustakaan dikumpulkan bersama di Newbler dan urutan konsensus secara komputasi diparut menjadi 2-kbp yang tumpang tindih dengan pembacaan palsu (sobekan). Pembacaan mentah juga dikumpulkan di Velvet dan urutan konsensus tersebut secara komputasi diparut menjadi potongan-potongan 1,5-kbp yang tumpang tindih. Draft data dari semua platform kemudian dikumpulkan bersama dengan Allpaths dan urutan konsensus secara komputasi diparut menjadi potongan-potongan berukuran 10 kbp yang tumpang tindih. Kami kemudian mengintegrasikan potongan konsensus Newbler, potongan konsensus Velvet, potongan konsensus Allpaths, dan subset dari pasangan baca sisipan panjang menggunakan Phrap (High Performance Software, LLC) paralel. Kemungkinan kesalahan perakitan telah diperbaiki dan beberapa penutupan celah diselesaikan dengan pengeditan manual di Consed.

2.5. Media Potato Dextrose Agar

Karena memiliki pH yang rendah, PDA (potato dextrose agar) adalah media yang umum untuk pertumbuhan jamur di laboratorium. Pada (pH 4,5–5,6) media PDA untuk menghambat

pertumbuhan bakteri yang mendesak situasi netral dengan pH 7,0 dan suhu tumbuh paling baik pada 25-30°C.

PDA terdiri dari bahan alami (kentang) dan bahan sintesis (dextrose dan agar), sehingga termasuk dalam media semi sintetik. Kentang merupakan sumber karbon atau karbohidrat, energi dan vitamin dengan dextrose sebagai sumber gula dan energi, serta bagian untuk berfungsi untuk menambah media ke PDA. Masing-masing dari ketiga elemen ini memiliki peran sangat penting bagi perkembangan dan perkembangan bakteri terutama jamur.

Media PDA instan dibuat oleh perusahaan atau pabrik tertentu dalam bentuk sediaan siap pakai, tetapi mahal dan higroskopis. Mahal harganya rata-rata instant yang berkisar antara Rp 500.000,- dan Rp 1.500.000,00 untuk setiap 500 gram, dan lebih banyak lagi sumber alam yang berguna sebagai pertumbuhan mikroorganisme di media untuk membantu para peneliti menemukan sumber daya alternatif yang terbuat dari bahan-bahan yang mudah didapat tanpa biaya yang mahal dan dapat menurunkan total biaya yang harus dibayarkan dalam proyek penelitian. Bahannya harus mengandung nutrisi penting untuk pertumbuhan seperti material kaya akan karbohidrat dan protein.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Riset

Tempat pelaksanaan riset bertempat di Laboratorium Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Surabaya dan berlangsung selama 4 bulan.

3.2 Variabel Riset

Variabel bebas : pH media PDA dan suhu produksi metabolit antibakteri

Variabel terikat : indeks aktivitas antibakteri

3.3 Tahapan Riset

Alat : Autoclave, inkubator, vortex, spektrofotometer UV-Vis, pH meter, jangka sorong, dan timbangan digital.

Bahan : Isolat *Bacillus tequilensis* BSMF simbiosis *Halichondria panicea*, media *Potato Dextrose Agar* sebagai media pertumbuhan dan media kultur persediaan, larutan NaCl p.a 0,9%, dapar fosfat KH_2PO_4 dan K_2HPO_4 p.a (pH 5 - 8), media *Nutrient Agar* untuk uji aktivitas antibakteri, bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diperoleh dari Unit Layanan Pengujian (ULP) Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

3.4 Prosedur Riset

A. Peremajaan isolat *Bacillus tequilensis* BSMF

1. Buat media PDA dari larutan infusa 100 g kentang, 10 g agarosa, dan 9 g dekstrosa dalam 500 mL air suling
2. Ambil satu Öse isolat *B. tequilensis* BSMF dari tabung reaksi, lalu goreskan pada media PDA miring (*slant agar*) 10 mL
3. Inkubasi media PDA miring pada suhu 37°C selama 24 jam (Atlas, 2010)
4. Amati pertumbuhan koloni *B. tequilensis* BSMF yang terbentuk

B. Produksi biomassa *Bacillus tequilensis* BSM-F

1. Kultur *B. tequilensis* BSMF ditambah dengan larutan NaCl 0,9%, campur dengan bantuan vortex hingga terbentuk suspensi
2. Ambil menggunakan mikropipet sebanyak 100 µL suspensi isolat *B. tequilensis* BSMF (transmitan 25% pada panjang gelombang 580 nm)

3. Hitung jumlah bakteri yang hidup secara ALT (Angka Lempeng Total) minimal sejumlah 10^6 cfu/ mL
4. Campurkan suspensi isolat *B. tequilensis* BSM-F pada 20 mL media PDA yang telah diatur menggunakan dapar fosfat 0,05 M menjadi pH 5, 6, 7, dan 8
5. Pengukuran pH menggunakan alat pH meter dilakukan dengan replikasi 3 kali
6. Campuran suspensi isolat *B. tequilensis* BSM-F dan media divortex dan dilakukan inkubasi pada suhu 28°C, 32°C, dan 37°C selama 72 jam. Maka akan diperoleh biomassa sel yang akan menghasilkan metabolit.
7. Lakukan sampling pada jam ke-72 untuk menguji aktivitas antibakteri

C. Pengujian aktivitas antibakteri

1. Pengujian dilakukan dengan metode difusi agar modifikasi
2. Dibuat media uji yang terdiri dari 2 lapis media *Nutrient Agar* yaitu 12 mL sebagai lapisan dasar atau *base layer* dan 8 mL *seed layer*.
3. Dibuat 8 mL lapisan atas atau *seed layer* dari 3 μ L suspensi bakteri uji (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 BSM-F) diukur persen transmisinya mencapai 25% transmitan pada panjang gelombang 580 nm dengan alat spektrofotometer visibel. Tambahkan 100 μ L suspensi bakteri yang diambil dengan pipet ke dalam 8 mL *Nutrient Agar* hangat dan campur dengan bantuan *vortex* kemudian, tuang *seed layer* di atas *base layer* hingga memadat.
4. Media fermentasi yang telah ditumbuhi biomassa *B. tequilensis* BSMF dicongkel menggunakan silinder pencetak dengan diameter 7,50 mm kemudian, letakkan di atas permukaan media yang sudah diinokulasi dengan bakteri uji (El-Naggar et al., 2009).
5. Lakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam dan dilakukan pengamatan setiap 24 jam.
6. Ukur zona jernih yang tampak di sekitar agar yang mengandung koloni *B. tequilensis* BSMF menggunakan jangka sorong
7. Penentuan aktivitas antibakteri dinyatakan dalam zona hambat dan indeks aktivitas antibakteri. Zona hambat adalah daerah jernih akibat terhambatnya pertumbuhan bakteri oleh uji aktivitas antibakteri yang berada di sekitar koloni *B. tequilensis* BSMF. Sedangkan indeks aktivitas antibakteri adalah nilai hasil perbandingan antara diameter zona hambat dengan diameter koloni (Surjowardojo, P., Susilorini, T. E. & Benarivo, 2016).
Indeks aktivitas = diameter zona hambat (mm) : diameter koloni (mm)

D. Analisis uji statistik

1. Penelitian ini menggunakan variabel bebas berupa pH media PDA dan suhu produksi metabolit antibakteri.
2. pH media diatur dengan menggunakan dapar fosfat 0,05 M menjadi pH 5, 6, 7, dan 8.
3. Inkubasi menggunakan suhu 28°C, 32°C, dan 37°C. Aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 diuji setelah 72 jam
4. Hasil uji berupa indeks aktivitas antibakteri sebagai variabel tergantung yang diperoleh akan diolah berdasarkan uji statistik melalui aplikasi IBM Statistical Package for the Social Sciens (SPSS) versi 24 agar diketahui adanya perbedaan pH media dan suhu inkubasi pada proses produksi metabolit antibakteri yang optimum dengan menggunakan metode *Two-way* ANOVA (*Analysis of Variance*).

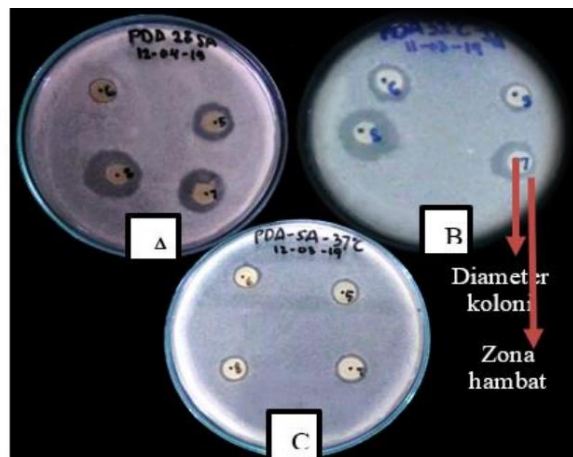
BAB IV

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan PDA yang mengandung sumber karbon berupa dekstrosa dan sumber nitrogen dalam infus kentang sebagai media produksi metabolit antibakteri. Karbon merupakan sumber energi bagi bakteri untuk melakukan biosintesis metabolit, sedangkan nitrogen merupakan unsur penyusun asam amino biokatalisator pembentukan metabolit antibakteri seperti enzim NRPS dan PKS. Metabolit yang dihasilkan isolat *B. tequilensis* BSMF simbiotik *Halichondria panicea* diuji aktivitas antibakterinya terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sebagai bakteri gram positif dan *Escheria coli* ATCC 25922 sebagai bakteri gram negatif sehingga diperoleh antibakteri yang efektif menghambat bakteri gram positif maupun gram negatif.

1. Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

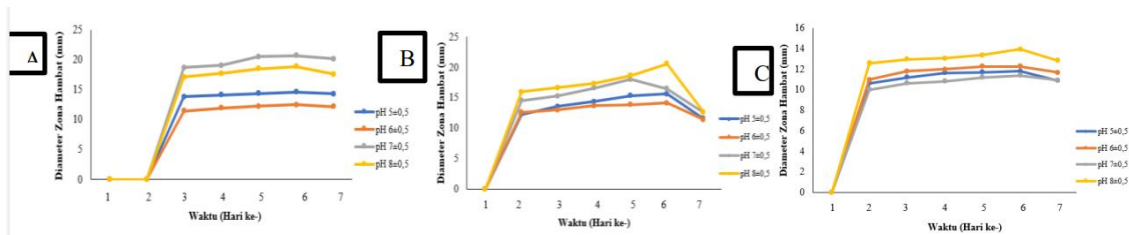
Aktivitas antibakteri dari *B. tequilensis* BSMF terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diamati tiap 24 jam dalam kurun waktu 7 hari. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dikatakan positif apabila terbentuk daerah jernih di sekitar koloni *B. tequilensis* BSMF (Gambar 1). Hal tersebut menunjukkan pertumbuhan bakteri uji terhambat sehingga disebut zona hambat. Zona hambat kemudian dihitung diameternya menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm.



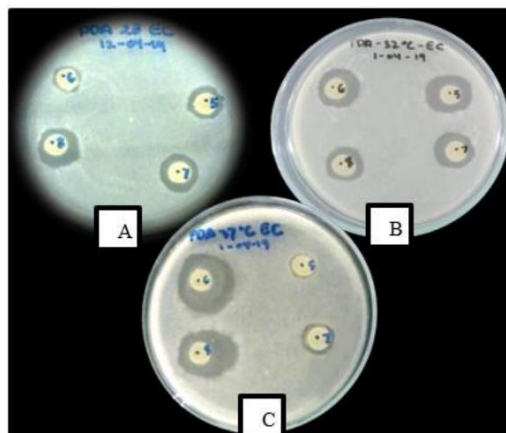
Gambar 1. Hasil pengamatan uji aktivitas antibakteri *Bacillus tequilensis* BSMF terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada media PDA pH $5 \pm 0,5$; $6 \pm 0,5$; $7 \pm 0,5$; dan $8 \pm 0,5$ suhu inkubasi $28 \pm 1^\circ\text{C}$ (A), $32 \pm 1^\circ\text{C}$ (B), dan $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (C)

Pengamatan terhadap zona hambat sebagai indikasi aktivitas antibakteri dilakukan pada pH media 5 - 8 dan suhu inkubasi $28 \pm 1^\circ\text{C}$, $32 \pm 1^\circ\text{C}$, dan $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Suhu inkubasi tersebut menyesuaikan rentang suhu tumbuh bagi bakteri mesofil yaitu $25 - 50^\circ\text{C}$ karena *B. tequilensis* BSMF termasuk bakteri mesofil. Pemilihan suhu merupakan salah satu parameter yang akan mempengaruhi kinerja enzim PKS dan NRPS untuk melakukan sintesis metabolit sekunder dengan aktivitas antibakteri (Moreira et al., 2020). Suhu terlalu tinggi dapat mengakibatkan denaturasi sedangkan suhu yang terlampau rendah akan menginaktivasi enzim.

Pada saat suhu inkubasi $28 \pm 1^\circ\text{C}$, zona hambat mulai terbentuk di sekitar koloni setelah 3 hari (72 jam), sedangkan ketika suhu $32 \pm 1^\circ\text{C}$ dan $37 \pm 1^\circ\text{C}$ zona hambat terbentuk setelah 2 hari (48 jam). Ukuran diameter zona hambat terus meningkat selama 6 hari (144 jam) dan mulai menurun setelah 7 hari (168 jam) (Gambar 2). Berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hambat tersebut, dapat diketahui aktivitas antibakteri isolat *B. tequilensis* BSMF pada suhu inkubasi $28 \pm 1^\circ\text{C}$, $32 \pm 1^\circ\text{C}$, dan $37 \pm 1^\circ\text{C}$ mencapai maksimal setelah 6 hari (144 jam).



Gambar 2. Profil aktivitas antibakteri *Bacillus tequilensis* BSMF terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (A = suhu $28 \pm 1^\circ\text{C}$; B = suhu $32 \pm 1^\circ\text{C}$; C = suhu $37 \pm 1^\circ\text{C}$)



Gambar 3. Hasil pengamatan uji aktivitas antibakteri *Bacillus tequilensis* BSMF terhadap *Eschericia coli* ATCC 25922 pada media PDA pH $5 \pm 0,5$; $6 \pm 0,5$; $7 \pm 0,5$; dan $8 \pm 0,5$ suhu inkubasi $28 \pm 1^\circ\text{C}$ (A), $32 \pm 1^\circ\text{C}$ (B), dan $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (C)

Data hasil pengukuran diameter zona hambat maksimum yaitu setelah 6 hari (144 jam) dipergunakan untuk memperoleh nilai indeks aktivitas antibakteri isolat *B. tequilensis* BSMF terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Nilai indeks aktivitas antibakteri diperoleh melalui pembagian antara diameter zona hambat dengan diameter koloni isolat (7,50 mm).

Berdasarkan hasil perhitungan indeks aktivitas antibakteri, saat suhu inkubasi $28 \pm 1^\circ\text{C}$ aktivitas antibakteri tertinggi dari isolat *B. tequilensis* BSMF terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 terjadi pada pH $7 \pm 0,5$ sedangkan saat suhu $32 \pm 1^\circ\text{C}$ dan $37 \pm 1^\circ\text{C}$ tertinggi pada pH 8 (Tabel 1) namun belum dapat ditentukan pH dan suhu yang optimum sehingga selanjutnya dilakukan analisis melalui pengujian statistik.

Tabel 1. Indeks aktivitas antibakteri isolat *Bacillus tequilensis* BSMF terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 di hari ke-6

pH media PDA	Indeks Aktivitas Antibakteri		
	Suhu $28 \pm 1^\circ\text{C}$	Suhu $32 \pm 1^\circ\text{C}$	Suhu $37 \pm 1^\circ\text{C}$
pH $5 \pm 0,5$	$1,95 \pm 0,08$	$2,08 \pm 0,07$	$1,58 \pm 0,05$
pH $6 \pm 0,5$	$1,66 \pm 0,06$	$1,89 \pm 0,02$	$1,64 \pm 0,03$
pH $7 \pm 0,5$	$2,76 \pm 0,05$	$2,20 \pm 0,12$	$1,52 \pm 0,07$
pH $8 \pm 0,5$	$2,49 \pm 0,06$	$2,74 \pm 0,07$	$1,86 \pm 0,07$

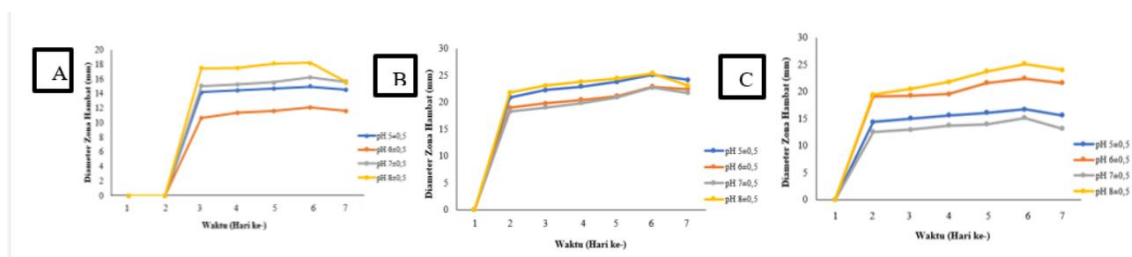
Hasil uji *Two-way* ANOVA memberikan nilai $F = 39,348 > F$ tabel (3,28) dan nilai signifikan $= 0,000 < \alpha = 0,05$ menunjukkan ada perbedaan indeks aktivitas antibakteri antara kelompok pH media dan suhu inkubasi. pH dan suhu yang memiliki pengaruh terbesar pada aktivitas antibakteri *B. tequilensis* BSMF terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diuji melalui *Post Hoc Multiple Comparisons* diperoleh *mean difference* terbesar pada pH 8,0 dan suhu $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

2. Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Eschericia coli* ATCC 25922

Pengamatan aktivitas antibakteri isolat *B. tequilensis* BSMF terhadap *Eschericia coli* ATCC 25922 dilakukan setiap 24 jam selama 7 hari. Aktivitas antibakteri berupa ukuran diameter zona hambat dibandingkan pada berbagai kondisi pengaturan suhu inkubasi ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, $32 \pm 1^\circ\text{C}$,

$37 \pm 1^\circ\text{C}$) dan pH media (5,6,7,8) seperti pada Gambar 3. Rentang pH media yang digunakan disesuaikan pH produksi metabolit antibakteri dari *Bacillus sp.* seperti penelitian yang dilakukan Afriyanto dkk. (2019) yaitu pada pH 5 – 9. Kondisi pH yang terlampau asam atau basa dapat menghambat metabolisme sel bakteri melalui mekanisme kesetimbangan gradien konsentrasi $[\text{H}^+]$ pada transpor membran. Hal ini akan berpengaruh terhadap pertumbuhan dan pembentukan metabolit antibakteri.

Pada ketiga suhu inkubasi yaitu $28 \pm 1^\circ\text{C}$, $32 \pm 1^\circ\text{C}$, dan $37 \pm 1^\circ\text{C}$ zona hambat terbentuk setelah 2 hari (48 jam). Ukuran dari diameter zona hambat semakin meningkat sampai hari ke-6 (144 jam). Ukuran diameter zona hambat yang meningkat maka aktivitas antibakteri juga semakin meningkat. Setelah 7 hari (168 jam), terjadi penurunan diameter zona hambat seperti tampak pada Gambar 4. Penurunan dapat berlangsung sebab pertumbuhan *B. tequilensis* BSMF telah memasuki *death phase* yakni fase ketika bakteri yang hidup jumlahnya lebih sedikit dibandingkan bakteri yang mati, akibatnya metabolit antibakteri yang diproduksi menurun sehingga mengakibatkan diameter zona hambat menurun pula.



Gambar 4. Profil aktivitas antibakteri *Bacillus tequilensis* BSMF terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 (A = suhu $28 \pm 1^\circ\text{C}$; B = suhu $32 \pm 1^\circ\text{C}$; C = suhu $37 \pm 1^\circ\text{C}$)

Berdasarkan data yang diperoleh, dapat diketahui antibakteri dari *B. tequilensis* BSMF memiliki daya hambat kuat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan rata-rata diameter zona hambat $12,12 \pm 0,30 - 25,38 \pm 0,56$ mm sebab Surjowardojo dkk. (2016) menyatakan diameter zona hambat 11 – 20 mm merupakan salah satu parameter daya hambat yang poten. Data pada hari ke-6 (144 jam) diolah untuk memperoleh nilai indeks aktivitas antibakteri isolat *B. tequilensis* BSMF terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Nilai indeks aktivitas antibakteri diperoleh melalui pembagian antara diameter zona hambat dengan diameter koloni isolat (7,50 mm).

Hasil perhitungan indeks aktivitas antibakteri tampak pada Tabel 2. Nilai indeks berbanding lurus dengan zona hambat sehingga semakin tinggi indeks maka semakin besar zona hambat sehingga potensi aktivitas antibakteri semakin tinggi. Aktivitas antibakteri tertinggi dari isolat *B. tequilensis* BSMF terhadap *Eschericia coli* ATCC 25922 terjadi pada pH media $8 \pm 0,5$ dengan suhu inkubasi $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Penentuan pH dan suhu yang optimum dilakukan melalui analisis uji statistik.

Tabel 2. Indeks aktivitas antibakteri isolat *Bacillus tequilensis* BSMF terhadap *Eschericia coli* ATCC 25922 di hari ke-6

pH media PDA	Indeks Aktivitas Antibakteri		
	Suhu $28 \pm 1^\circ\text{C}$	Suhu $32 \pm 1^\circ\text{C}$	Suhu $37 \pm 1^\circ\text{C}$
pH $5 \pm 0,5$	$2,00 \pm 0,03$	$3,34 \pm 0,09$	$2,23 \pm 0,03$
pH $6 \pm 0,5$	$1,62 \pm 0,03$	$3,06 \pm 0,02$	$2,99 \pm 0,03$
pH $7 \pm 0,5$	$2,17 \pm 0,05$	$3,04 \pm 0,06$	$2,02 \pm 0,04$
pH $8 \pm 0,5$	$2,43 \pm 0,07$	$3,39 \pm 0,07$	$3,36 \pm 0,05$

Hasil uji *Two-way* ANOVA memberikan nilai $F = 142,244 > F$ tabel (3,28) dan nilai signifikan = $0,000 < \alpha = 0,05$ menunjukkan ada perbedaan indeks aktivitas antibakteri antara kelompok pH media dan suhu inkubasi. pH dan suhu yang memiliki pengaruh terbesar pada aktivitas antibakteri *B. tequilensis* BSMF terhadap *Eschericia coli* ATCC 25922 diuji melalui *Post Hoc Multiple Comparisons* diperoleh *mean difference* terbesar pada pH 8,0 dan suhu $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Sehingga berdasarkan hasil analisa statistik menunjukkan terdapat pengaruh antara pH dan suhu terhadap aktivitas antibakteri isolat *B. tequilensis* BSMF terhadap *Eschericia coli* ATCC 25922.

BAB V

KESIMPULAN

Sesuai hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa *B. tequilensis* BSMF simbiotik *Halichondria panicea* asal Perairan Desa Cabbiya Madura dapat memproduksi metabolit yang memiliki aktivitas antibakteri. Kondisi pH media dan suhu inkubasi optimum dalam proses produksi metabolit antibakteri isolat *B. tequilensis* BSMF pada media PDA yaitu pada pH $8 \pm 0,5$ serta suhu $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Penelitian selanjutnya dapat dilakukan purifikasi dan identifikasi senyawa aktif metabolit antibakteri yang dihasilkan *B. tequilensis* BSMF.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, R. M. (2010). Handbook of Microbiological Media. In *Handbook of Microbiological Media*.
<https://doi.org/10.1201/ebk1439804063>
- Cuadrat, R. R. C., Sorokina, M., Andrade, B. G., Goris, T., & Dávila, A. M. R. (2020). Global ocean resistome revealed: Exploring antibiotic resistance gene abundance and distribution in TARA Oceans samples. *GigaScience*, *9*(5), 1–12. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa046>
- Damar, G. (2019). *Penapisan dan Identifikasi Bakteri Laut Penghasil Antibakteri Simbiotik Halichondria panicea dari Pantai Cabbiya Madura dengan Analisis Gen 16S rRNA*. Universitas Airlangga Surabaya.
- El-Naggar, M. Y., El-Assar, S. A., & Abdul-Gawad, S. M. (2009). Solid-state fermentation for the production of meroparamycin by *Streptomyces* sp. strain MAR01. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *19*(5), 468–473. <https://doi.org/10.4014/jmb.0807.457>
- Hasan, T. H., & Al-Harmoosh, R. A. (2020). Mechanisms of antibiotics resistance in bacteria. *Systematic Reviews in Pharmacy*, *11*(6), 817–823. <https://doi.org/10.31838/srp.2020.6.118>
- Kemenkes RI. (2020). *Farmakope Indonesia VI* (VI). Kementerian Kesehatan Indonesia.
- Khan, Z., Shafique, M., Nawaz, H. R., Jabeen, N., & Naz, S. A. (2019). *Bacillus tequilensis* ZMS-2: A novel source of alkaline protease with antimicrobial, anti-coagulant, fibrinolytic and dehairing potentials. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, *32*(4), 1913–1918.
- Kiran, G. S., Priyadharsini, S., Sajayan, A., Ravindran, A., & Selvin, J. (2018). An antibiotic agent pyrrolo[1,2-: A] pyrazine-1,4-dione,hexahydro isolated from a marine bacteria *Bacillus tequilensis* MSI45 effectively controls multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *RSC Advances*, *8*(32), 17837–17846. <https://doi.org/10.1039/c8ra00820e>
- Moreira, S. M., De Oliveira Mendes, T. A., Santanta, M. F., Huws, S. A., Creevey, C. J., & Mantovani, H. C. (2020). Genomic and gene expression evidence of nonribosomal peptide and polyketide production among ruminal bacteria: A potential role in niche colonization? *FEMS Microbiology Ecology*, *96*(2), 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz198>
- Rajendran, S. (2019). Marine Sponges: Repositories of Bioactive compounds with Medicinal

applications. *International Journal of ChemTech Research*, 12(01), 26–48.
<https://doi.org/10.20902/ijctr.2019.120103>

Santanumurti, M. B., Samara, S. H., & Nindarwi, D. D. (2019). Water Quality in the North Madura : Is It Suitable for Vannamei Shrimp Farming or Not? *Aquasains*, 8(1), 753.
<https://doi.org/10.23960/aqs.v8i1.p753-758>

Surjowardojo, P., Susilorini, T. E. & Benarivo, V. (2016). DAYA HAMBAT DEKOK KULIT APEL MANALAGI (*Malus sylvestris* Mill) TERHADAP PERTUMBUHAN *Escherichia coli* DAN *Streptococcus agalactiae* PENYEBAB MASTITIS PADA SAPI PERAH. *Jurnal Ternak Tropika*, 17, 11–21.

Trianto, A., Radjasa, O. K., Sabdono, A., Muchlissin, S. I., Afriyanto, R., Sulistiowati, Radjasa, S. K., Crews, P., & McCauley, E. (2019). Exploration culturable bacterial symbionts of sponges from ternate islands, Indonesia. *Biodiversitas*, 20(3), 776–782. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d200323>

Uribe-Lorío, L., Brenes-Guillén, L., Hernández-Ascencio, W., Mora-Amador, R., González, G., Ramírez-Umaña, C. J., Díez, B., & Pedrós-Alió, C. (2019). The influence of temperature and pH on bacterial community composition of microbial mats in hot springs from Costa Rica. *MicrobiologyOpen*, 8(10), 1–26. <https://doi.org/10.1002/mbo3.893>

Yoghiapiscessa, D., Batubara, I., & Wahyudi, A. T. (2016). Antimicrobial and antioxidant activities of bacterial extracts from marine bacteria associated with sponge *Stylotella* sp. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 12(1), 36–46. <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2016.36.46>

LAMPIRAN

NO	URAIAN	JAM KERJA/MINGGU	HONOR/JAM	JUMLAH
1	Ketua	10 Jam x 2	Rp 60.000,00	Rp 120.000,00
2	Anggota	10 Jam x 2	Rp 50.000,00	Rp 100.000,00
3	Pembantu Teknis Lapangan	6 jam x 2	Rp 40.000,00	Rp 80.000,00
Jumlah Biaya				Rp 300.000,00

2 Bahan Habis Pakai dan Peralatan

No	Bahan	Volume	Biaya Satuan	Biaya
1	Kertas HVS 80 gram A4	1 rim	Rp 100.000,00	Rp 100.000,00
2	Tinta Refill Printer HP 360	2 buah	Rp 180.000,00	Rp 360.000,00
3	Alat Tulis	4 Pack	Rp 50.000,00	Rp 200.000,00
4	Materai	19 buah	Rp 10.000,00	Rp 190.000,00
5	Buku Pedoman	20 bh	Rp 35.000,00	Rp 700.000,00
6	Biaya Paket Pulsa	52	Rp 50.000,00	Rp 2.600.000,00
Jumlah Biaya				Rp 4.150.000,00

3 Rincian Pengumpulan dan Pengolahan Data, Laporan, Publikasi Seminar dan Lain-lain

No	Komponen	Volume	Biaya Satuan	Jumlah
1	Pengumpulan dan Pengolahan Data	1	Rp 500.000,00	Rp 500.000,00
2	Penyusunan Laporan	3	Rp 150.000,00	Rp 450.000,00
3	Desiminasi/ Seminar	1	Rp 300.000,00	Rp 300.000,00
4	Publikasi / jurnal	1	Rp 800.000,00	Rp 800.000,00
Jumlah Biaya				Rp 2.050.000,00

4 Perjalanan

Material	Tujuan	Kuantitas	Jumlah
Ketua	a. Pengorganisasian Persiapan Kegiatan	100 kali	Rp 2.000.000,00
	b. Pendampingan Pendidikan dari UMSurabaya		
	c. Evaluasi Kegiatan, dll		
Anggota	a. Pengorganisasian Persiapan Kegiatan	50 kali	Rp 1.500.000,00
	b. Pendampingan Pendidikan dari UMSurabaya		
	c. Evaluasi Kegiatan, dll		
SUB TOTAL			Rp 3.500.000,00

TOTAL KESELURUHAN

**Rp
10.000.000,00**

SURAT TUGAS

Nomor: 77/TGS/II.3.AU/LPPM/F/2021

Assalaamu'alaikum Wr. Wb.

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Dede Nasrullah, S.Kep., Ns., M.Kep
Jabatan : Kepala LPPM
Unit Kerja : LPPM Universitas Muhammadiyah Surabaya

Dengan ini menugaskan:

No	Nama	NIDN/NIM	Jabatan
1.	Dr. Apt. Isnaeni, MS	8983050022	Dosen UMSurabaya
2.	Hilman Kasyfil Isyrafı	20211666037	Mahasiswa UMSurabaya
3.	Yuliansyah Nurista	20201666026	Mahasiswa UMSurabaya

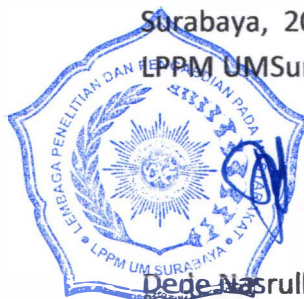
Untuk melaksanakan penelitian kepada masyarakat dengan judul "Optimasi Kondisi Fermentasi Pada Produksi Metabolit Antibakteri Dari Bacillus Tequilensis BSMF Simbiotik Halichonhondria Panicea". Penelitian ini dilaksanakan di Program Studi S1 Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan UMSurabaya pada tahun akademik 2021-2022.

Demikian surat tugas ini, harap menjadikan periksa dan dapat dilaksanakan dengan penuh tanggung jawab.

Wassalaamu'alaikum Wr. Wb

Surabaya, 20 Agustus 2021

LPPM UMSurabaya



Dede Nasrullah, S.Kep., Ns., M.Kep

NIP. 012.05.1.1987.14.113

Surat Kontrak Penelitian Internal
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENELITIAN KEPADA MASYARAKAT (LPPM)
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURABAYA
Nomor: 77/SP/II.3.AU/LPPM/F/2021

Pada hari ini **Senin** tanggal **Dua Puluh** bulan **Agustus** tahun **Dua Ribu Dua Puluh Satu**, kami yang bertandatangan dibawah ini :

1. Dede Nasrullah, S.Kep., Ns., M.Kep. : Kepala LPPM UMSurabaya yang bertindak atas nama Rektor UMSurabaya dalam surat perjanjian ini disebut sebagai **PIHAK PERTAMA**;
2. Dr. Apt. Isnaeni, MS : Dosen UM Surabaya, yang selanjutnya disebut **PIHAK KEDUA**.

untuk bersepakat dalam pendanaan dan pelaksanaan program penelitian:

- Judul** : Optimasi Kondisi Fermentasi Pada Produksi Metabolit Antibakteri Dari *Bacillus Tequilensis* BSMF Simbiotik *Halichondria Panicea*
- Anggota** : Hilman Kasyfil Isyrafy, Yuliansyah Nurista

dengan ketentuan-ketentuan sebagai berikut:

1. **PIHAK PERTAMA** menyetujui pendanaan dan memberikan tugas kepada **PIHAK KEDUA** untuk melaksanakan program penelitian perguruan tinggi tahun 2021.
2. **PIHAK KEDUA** menjamin keaslian penelitian yang diajukan dan tidak pernah mendapatkan pendanaan dari pihak lain sebelumnya.
3. **PIHAK KEDUA** bertanggungjawab secara penuh pada seluruh tahapan pelaksanaan penelitian dan penggunaan dana hibah serta melaporkannya secara berkala kepada **PIHAK PERTAMA**.
4. **PIHAK KEDUA** berkewajiban memberikan laporan kegiatan penelitian dari awal sampai akhir pelaksanaan penelitian kepada LPPM selaku **PIHAK PERTAMA**.
5. **PIHAK KEDUA** berkewajiban menyelesaikan urusan pajak sesuai kebijakan yang berlaku.
6. **PIHAK PERTAMA** akan mengirimkan dana hibah penelitian internal sebesar Rp. 10.000.000,- (Sepuluh Juta Rupiah) ke rekening ketua pelaksana penelitian.
7. Adapun dokumen yang wajib diberikan oleh **PIHAK KEDUA** sebagai laporan pertanggungjawaban adalah:
 - a. menyerahkan Laporan Hasil penelitian selambat-lambatnya satu minggu setelah kegiatan usai dilaksanakan
 - b. Memberikan naskah publikasi dan/atau luaran sesuai dengan ketentuan.



8. Jika dikemudian hari terjadi perselisihan yang bersumber dari perjanjian ini, maka **PIHAK PERTAMA** berhak mengambil sikap secara musyawarah.

Surat Kontrak Penelitian ini dibuat rangkap 2 (dua) bermaterai cukup, dan ditandatangani dengan nilai dan kekuatan yang sama.

Pihak Pertama



Dede Nasrullah, S.Kep., Ns., M.Kep
NIP. 012.05.1.1987.14.113

Pihak Kedua

Dr. Apt. Isnaeni, MS
NIDN. 8983050022



KUITANSI

Sudah terima dari : Bendahara LPPM
Uang sebesar : Sepuluh Juta Rupiah (dengan huruf)
Untuk pembayaran : Pelaksanaan penelitian dengan pendanaan Internal

Rp. 10.000.000,00

Surabaya, 20 Agustus 2021

Bendahara LPPM,
Universitas Muhammadiyah Surabaya

Holy Ichda Wahyuni

Ketua Penelitian

Dr. Apt. Isnaeni, MS