

MUTATION ON *Bacillus subtilis* BAC4 USING ACRIDINE ORANGE AS AN EFFORT FOR INCREASING ANTIBIOTIC PRODUCTION

Mutasi pada Bacillus subtilis BAC4 dengan Larutan Akridin Oranye sebagai Upaya Peningkatan Produksi Antibiotika

Supartono^{1*}, Nanik Wijayati¹, Lina Herlina², and Enny Ratnaningsih³

¹Chemistry Department, Gd. D6-2nd floor, FMIPA UNNES Sekaran Gunungpati Semarang, 50229.

²Biology Department, Gd D6-1st floor, FMIPA UNNES Sekaran Gunungpati Semarang, 50229.

³Chemistry Department, FMIPA ITB, Jl. Ganesha No. 10 Bandung, 40132.

Received 19 March 2008; Accepted 1 May 2008

ABSTRACT

The efforts to get a new antibiotic require to be done continuously, because infection diseases still become the main health problems in Indonesia. A new local strain of *Bacillus subtilis* BAC4 has been known producing an antibiotic that inhibites *Serratia marcescens* ATCC 27117 growth. Nevertheless, the optimum conditions have not been studied seriously. The objective of this research was to conduct mutation on *B. subtilis* BAC4 in order to obtain a mutant cell that overproducts in producing antibiotic. The mutation process was performed by using acridine orange of 1 g.L^{-1} randomly at various volumes. The production of antibiotic was conducted using batch fermentation and antibiotic assay was performed with agar absorption method using *S. marcescens* ATCC 27117 as bacteria assay. Research result provided a *B. subtilis* M10 mutant with overproduction of antibiotic. Characterization of *B. subtilis* M10 mutant showed that the mutant cell has size of $(0.5-1.0) \mu\text{m} \times (1.85-2.5) \mu\text{m}$; spore has the form of ellipse with thick wavy wall, positive reaction for catalase, and forming acid from glucose and xylose.

Keywords: mutant, *Bacillus*, acridin, and antibiotics.

PENDAHULUAN

Akhir-akhir ini banyak kita jumpai di tengah-tengah masyarakat berbagai macam jenis penyakit yang disebabkan oleh infeksi, baik oleh bakteri patogen maupun virus. Persoalan infeksi ini memang masih menjadi permasalahan kesehatan masyarakat yang utama di Indonesia. Hal ini disebabkan sebagian oleh penggunaan antibiotika sebagai obat penyakit infeksi yang tidak teratur dari masyarakat. Di sisi lain, juga banyak bakteri patogen yang ditemukan menjadi resisten terhadap berbagai antibiotika. Terutama bakteri-bakteri patogen gram positif, misalnya: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* dan *Enterococcus faecalis* [1-3]. Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa berbagai bakteri patogen dapat memproduksi enzim β -laktamase yang mampu menghidrolisis cincin β -laktam dan menonaktifkan penisilin-penisilin [4]. Oleh karena itu, upaya-upaya untuk menemukan antibiotika baru perlu dilakukan secara terus-menerus baik dari tanaman, hewan maupun bakteri.

Upaya untuk mendapatkan antibiotika dari tanaman dilakukan oleh Tsukiyama *et al* [5]. Ia mengisolasi likokalkon A dari akar tanaman *Glycyrrhiza inflata* dan ternyata aktif melawan pertumbuhan bakteri gram positif khususnya galur dari *Bacillus* spp. Kemudian, ekstrak etanol dari jamur *Ramaria flava* (Schaeff) berhasil diteliti aktivitas antimikrobanya melawan pertumbuhan berbagai bakteri [6]. Aktivitas

antibakteri dan antioksidan ekstrak heksan, etil asetat, etanol dan air daun *Eclipta prostrata* (L) juga berhasil diteliti melawan *Escherichia coli*, *Klesiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* dan *S. aureus* [7].

Upaya untuk mendapatkan antibiotika dari hewan dilakukan dengan peptida sekropin A dari nyamuk *Aedes aegypti* yang ternyata mampu menghambat pertumbuhan *Micrococcus luteus* A 270 suatu bakteri gram positif dan *E. coli* SBS 363 suatu bakteri gram negatif [8]. Sementara itu, aktivitas antibakteri dan antijamur dari vasostatin-1, fragmen terminal-N dari kromogranin A juga berhasil diteliti [9].

Selanjutnya, upaya untuk mendapatkan antibiotika dari bakteri juga banyak dilakukan oleh para peneliti. Beberapa di antaranya telah berhasil dan diproduksi secara besar-besaran, misalnya: basitrasin, suatu antibiotika polipeptida dari beberapa galur *B. licheniformis* dan *B. subtilis* telah diproduksi dalam skala industri dan dipasarkan. Pengaruh pH dan glukosa pada produksi basitrasin oleh *B. subtilis* C 126 berhasil diteliti [10]. Campuran basitrasin A, B, C, D, E dan F berhasil dipisahkan menjadi beberapa isomernya melalui HPLC [11]. Penggunaan basitrasin sebagai promotor pertumbuhan hewan-hewan dan tidak mengganggu kesehatan manusia berhasil juga diteliti [12]. Kemudian, produksi kanosamin (3-amino-3-deoksi-D-glukosa) oleh *B. cereus* UW 85 juga

* Corresponding author. Tel/Fax : +62-24-8508035
Email address : tonosupartono@lycos.com

berhasil diteliti [13]. Di sisi lain, pengaruh protease lon pada produksi antibiotika pyoluteorin oleh *P. fluorescens* Pf-5 telah berhasil diteliti juga [14]. Di samping itu, produksi bacilyosin oleh *B. subtilis* 168 juga berhasil dipelajari [15]. Bahkan adanya *cluster* gen dalam *B. subtilis* 3610 pengkode antibiotika basilaene yang mampu melawan *Streptomyces avermitilis* berhasil diidentifikasi. Antibiotika dari mutan *B. subtilis* M 40 yang aktif menghambat pertumbuhan patogen-patogen tanaman seperti *Botrytis cinerea*, *Ralstonia solanacearum* dan *Erwinia carotovora* var. berhasil diisolasi dan dimurnikan [16].

Suatu galur lokal baru *Bacillus* sp. BAC4 teridentifikasi menghasilkan antibiotika yang menghambat pertumbuhan *Serratia marcescens* ATCC 27117 suatu bakteri gram negatif [17]. Galur lokal ini menunjukkan kesamaan yang tinggi dengan *B. subtilis* [18]. Terhadap sel *B. subtilis* BAC4 perlu dilakukan mutasi agar diperoleh sel mutan yang mampu memproduksi antibiotika secara berlebihan. Penelitian ini dimaksudkan untuk melakukan mutasi sel *B. subtilis* BAC4 dengan larutan akridin oranye dan mengkarakterisasi sel mutan yang diperoleh.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan di antaranya adalah akridin oranye, bakto pepton, ekstrak ragi, glukosa, sorbitol, kalsium klorida dihidrat, feri klorida heksahidrat, bakto agar, ekstrak ragi, natrium klorida, urea, kapas dan alkohol. Semua bahan kimia yang digunakan baik untuk komponen media, pelarut dan pereaksi berkualitas proanalisis (PA) produk dari *Merck*, *Sigma* dan *Fluka*. Biakan *B. subtilis* BAC4 dan *S. marcescens* ATCC 27117 diperoleh dari laboratorium mikrobiologi ITB Bandung.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah: *Laminar flow* (model BBF6), UV-Vis spektrofotometer (*Shimadzu*, UV-120-02), autoklaf (*GFL*), inkubator (*Water-Jacketed incubator cell culture*), *shaker* (CMC-4013), mikropipet 50 sampai dengan 1000 μL (*Eppendorf*), sentrifuga (*Centurion-05*), neraca listrik (*electronic digital-Mettler*), pH-meter (*Orion-40*), tabung reaksi, cawan patri, erlenmeyer, gelas kimia dan beberapa peralatan gelas penting lain.

Prosedur Kerja

Secara umum, penelitian ini bertujuan untuk memproduksi senyawa antibiotika oleh *B. subtilis* BAC4 galur lokal. Untuk mencapai tujuan tersebut terhadap sel *B. subtilis* BAC4 perlu dilakukan mutasi. Proses mutasi

dilakukan dengan menggunakan larutan akridin oranye 1 g.L^{-1} , kemudian dilakukan pemilihan mutan sehingga diperoleh sel mutan yang berpotensi overproduksi bagi senyawa-senyawa antibiotika. Pemilihan mutan dilakukan secara mikrobiologis dengan metode serapan agar menggunakan bakteri uji *S. marcescens* ATCC 27117 dan *B. subtilis* BAC4 *wild type* sebagai kontrol [19]. Selanjutnya, mutan yang diperoleh dikarakterisasi secara mikrobiologis baik morfologi maupun sifat-sifat biokimianya.

Pembuatan mutan dari *B. subtilis* BAC4

Pembuatan sel mutan *B. subtilis* BAC4 dilakukan secara acak, yaitu dengan menggunakan larutan akridin oranye 1 g.L^{-1} pada berbagai volume. Ke dalam lima tabung reaksi bertutup kapas masing-masing berisi 10 mL media biakan cair yang setiap literanya memiliki komposisi sebagai sorbitol 10 g, urea 1 g, dan pepton 10 g, pada pH 7,0 diinokulasikan biakan *B. subtilis* BAC4 sebanyak satu ose secara steril. Lalu inokulan diinkubasikan ke dalam inkubator goyang (*shaker*) pada suhu kamar ($26 \text{ }^\circ\text{C}$) dengan laju putaran 150 rpm. Setelah penginkubasian mencapai dua jam, ke dalam masing-masing inokulan ditambahkan larutan akridin oranye 1 g.L^{-1} dengan volume 0, 10, 20, 30, dan 40 μL . Biakan diinkubasi lebih lanjut di dalam *shaker* hingga 24 jam. Akhirnya, penginkubasian dihentikan untuk kemudian dilakukan pengukuran pertumbuhan sel pada $\lambda = 650 \text{ nm}$ dan pengujian aktivitas antibiotikanya.

Pengujian aktivitas antibiotika

Pengujian aktivitas antibiotika dilakukan secara mikrobiologis dengan metode serapan agar menggunakan bakteri uji *S. marcescens* ATCC 27117 dan *B. subtilis* BAC4 *wild type* sebagai kontrol [19]. Ke dalam cawan patri yang berisi media agar padat diletakkan lima *paper disc* steril, lalu pada *paper disc* tersebut ditotolkan sebanyak 10 μL biakan mutan *B. subtilis* BAC4 hasil proses mutasi. Biarkan selama tiga jam agar cairan fermentasinya meresap benar ke dalam media agar. Pekerjaan ini dilakukan secara steril di dalam *laminar flow*. Selanjutnya, cawan patri ditutup dan diinkubasi secara terbalik di dalam inkubator pada suhu $25 \text{ }^\circ\text{C}$ selama 12 jam. Kemudian, biakan dalam cawan patri tersebut dilapisi dengan campuran homogen dari 7 mL media agar pelapis dan 1 mL biakan fase pertumbuhan *S. marcescens* ATCC 27117, dan biarkan selama satu jam agar media pelapis tersebut memadat. Setelah itu, biakan dalam cawan patri tersebut ditutup dan diinkubasi kembali di dalam inkubator pada suhu $25 \text{ }^\circ\text{C}$ selama 24 jam. Terbentuknya zona bening di sekitar tolotan diamati dan diukur diameternya dengan menggunakan penggaris.

Karakterisasi sel mutan *B. subtilis* M10 secara biokimia

Identifikasi berdasarkan karakteristik dalam *Bergey's Manual for Bacteriology*:

- I. Kelompok *B. polymyxa*: Endospora oval, sentral dengan dinding tebal bergelombang, sel vegetatif membengkak, memerlukan nutrisi kompleks, anaerobik fakultatif.
- II. Kelompok *B. subtilis*: Endospora oval, sentral, sel vegetatif tidak membengkak, aerob/ anaerob akan sporulasi.
- III. Kelompok *B. brevis*: Endospora oval, sel vegetatif agak membengkak, sangat aerob, tidak menghasilkan asam dari gula, mempunyai metabolisme oksidatif dan reaksi basa pada medium pepton.
- IV. Kelompok *B. sphaericus*: Endospora spheris, terminal, sel vegetatif membengkak, *strict oxidative*, tidak menggunakan gula sebagai sumber C, lebih suka menggunakan asetat dan asam amino (glutamat) sebagai sumber C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan mutan dari *B. subtilis* BAC4

Proses mutasi *B. subtilis* BAC4 dengan menggunakan larutan akridin oranye memberikan hasil seperti ditunjukkan oleh Tabel 1 dan 2 serta Gambar 1. Tabel 1 menunjukkan bahwa penambahan larutan akridin oranye pada biakan sel *B. subtilis* BAC4 tidak mengganggu pertumbuhan sel secara signifikan. Kemudian, Tabel 2 menunjukkan ukuran diameter zona bening pada pengujian produksi antibiotika oleh sel mutan yang diperoleh. Hasil mutasi menunjukkan bahwa pada penambahan larutan akridin oranye sebanyak 10 μL , memberikan koloni *B. subtilis* mutan yang mampu menghambat pertumbuhan sel *S. marcescens* ATCC 27117 paling kuat. Hal ini dibuktikan oleh hasil pengujian aktivitas antibiotikanya yang menunjukkan diameter zona bening paling besar, yaitu rata-rata 47,5 mm. Sel mutan pada kondisi ini selanjutnya diberi tanda sebagai sel mutan *B. subtilis* M10.

Gambar 1 memperlihatkan hasil pengujian produksi antibiotika secara mikrobiologis oleh sel mutan yang diperoleh dengan *S. marcescens* ATCC 27117 sebagai bakteri uji. Mutan dengan volume larutan akridin oranye 10 μL memberikan koloni sel mutan *B. subtilis* yang mampu menghambat pertumbuhan sel *S. marcescens* ATCC 27117 paling kuat, sebab koloni mutan ini menunjukkan diameter zona bening paling besar. Pengujian aktivitas antibiotika dari mutan-mutan yang diperoleh memberikan hasil zona bening dengan diameter rata-rata seperti disajikan dalam Gambar 2. Dengan Gambar 2 dapat ditunjukkan bahwa volume larutan akridin oranye 1 g.L^{-1} yang paling optimal adalah 10 μL . Pada kondisi demikian kemampuan produksi

antibiotika mutan yang diperoleh menjadi 32% lebih besar dari galur aslinya. Hasil penelitian ini menyerupai hasil penelitian Bernal *et al.* [16], yaitu penggunaan larutan akridin oranye untuk memutasi sel *B. Subtilis* A47 dan

Tabel 1. Pertumbuhan sel *B. subtilis* BAC4 setelah proses mutasi.

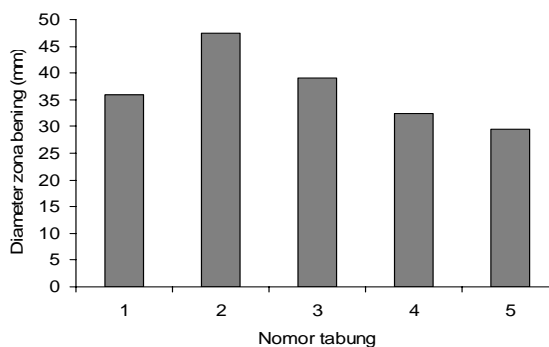
No.	Volume larutan akridin (μL)	A pada λ 650 nm			
		1	2	3	Rata-rata
1.	0 (kontrol)	0,637	0,637	0,637	0,537
2.	10	0,835	0,835	0,835	0,835
3.	20	0,932	0,936	0,932	0,933
4.	30	0,404	0,407	0,410	0,407
5.	40	0,422	0,424	0,424	0,424

Tabel 2. Diameter zona bening pada penghambatan pertumbuhan *S. marcescens* oleh sel mutan *B. subtilis* BAC4.

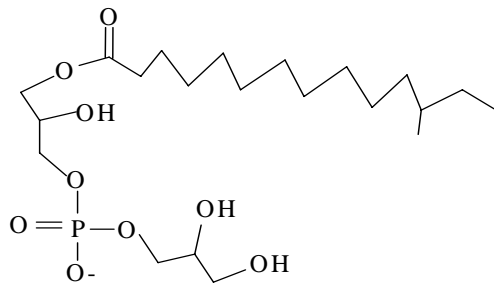
No.	Volume larutan akridin (μL)	Diameter zona bening (mm)			Keterangan
		1	2	Rata-rata	
1.	0 (kontrol)	41	31	36	
2.	10	55	40	47,5	Mutan M10
3.	20	35	33	39	
4.	30	34	31	32,5	
5.	40	32	27	29,5	



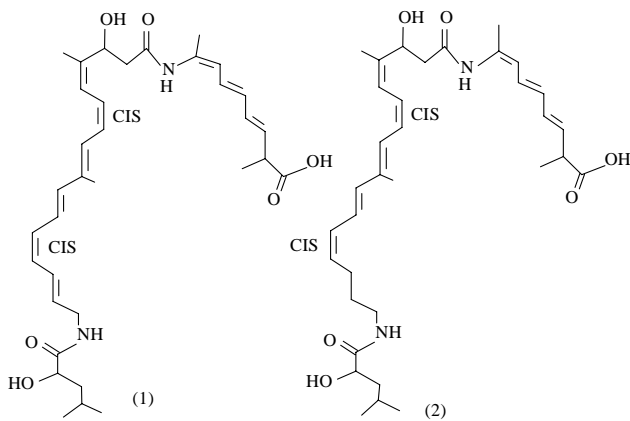
Gambar 1. Hasil pengujian produksi antibiotika oleh sel mutan *B. subtilis* BAC4 dengan larutan akridin oranye 1 g.L^{-1} pada berbagai konsentrasi.



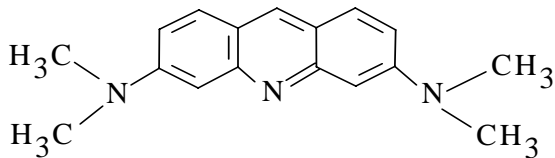
Gambar 2. Hasil pengujian aktivitas antibiotika dari mutan yang diperoleh.



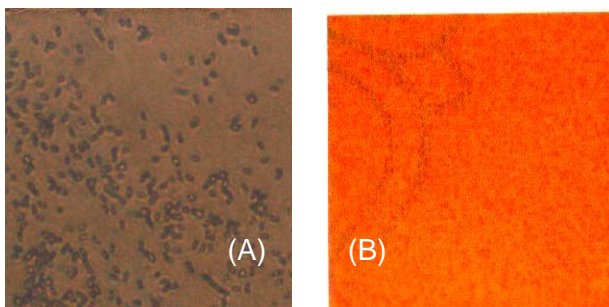
Gambar 3. Struktur kimia dari bacilycosin.



Gambar 4. Struktur kimia dari (1). basilaene dan (2). Dihydrobasilaene



Gambar 5. Struktur kimia akridin oranye.



Gambar 6. Hasil pengamatan morfologi sel [(A). *B. subtilis* BAC4 dan (B). *B. subtilis* M10].

memberikan sel mutan *B. subtilis* M40 yang mampu memproduksi antibiotika berlebihan penghambat pertumbuhan patogen tanaman *B. cinerea*, *R. solanacearum* dan *E. carotovora*. Menurut hasil analisisnya menunjukkan bahwa antibiotika tersebut menyerupai lipopeptida siklis semacam iturin [16].

Senyawa iturin merupakan suatu kelompok lipopeptida yang diekresi dari kebanyakan galur *B. subtilis* bila ditumbuhkan dalam media cair. Di samping itu, galur tertentu *B. subtilis* juga mampu memproduksi antibiotika bacilycosin, suatu antibiotika fosfolipid baru yang mampu menghambat pertumbuhan berbagai bakteri dan jamur. Gambar 3 menunjukkan struktur kimia dari bacilycosin. Bahkan Butcher *et al* [20], berhasil mengidentifikasi adanya *cluster* gen dalam *B. subtilis* 3610 pengkode antibiotika basilaene yang mampu melawan pertumbuhan *S. avermitilis*. Gambar 4 menunjukkan struktur kimia dari basilaene yang terdiri atas dua stereoisomer, yaitu: basilaene dan dihydrobasilaene.

Proses mutasi ini terjadi karena zat warna akridin oranye yang merupakan senyawa aromatis berinterkalasi ke dalam pasangan basa-basa molekul DNA sehingga dapat menyebabkan terjadinya penyisipan atau penghapusan basa-basa nukleotida selama proses replikasi [16]. Hasilnya dapat berupa pembentukan suatu protein yang cacat atau bahkan tidak terjadi pembentukan protein sama sekali. Gambar 5 menunjukkan struktur kimia dari akridin oranye yang digunakan sebagai zat mutagenik dalam penelitian ini [21].

Karakterisasi sel mutan *B. subtilis* M10

Sel mutan *B. subtilis* M10 hasil mutasi dengan larutan akridin oranye, selanjutnya dikarakterisasi secara mikrobiologis melalui pengamatan morfologi dan uji sifat-sifat biokimianya. Hasil karakterisasi ini ditunjukkan oleh Gambar 6 dan Tabel 3. Seperti ditunjukkan oleh Gambar 6 bahwa proses mutasi dengan larutan akridin oranye menyebabkan ukuran sel *B. subtilis* mengecil, dari berukuran (1,0–1,5) μm x (2,5– 4) μm menjadi (0,5–1,0) μm x (1,85 – 2,5) μm . Namun, seperti galur aslinya mutan M10 tetap merupakan bakteri gram positif. Morfologi dari sporanya juga mengalami perubahan, dari berbentuk bulat dengan dinding agak tebal menjadi elips dengan dinding tebal bergelombang. Kemudian, Tabel 3 menunjukkan bahwa proses mutasi dengan larutan akridin oranye menyebabkan terjadinya beberapa perubahan sifat biokimia, di antaranya yaitu: dari reaksi negatif katalase menjadi positif, reaksi negatif pembentukan asam dari glukosa dan xylosa menjadi positif. Beberapa sifat biokimia memang masih dipertahankan tetap, misalnya pertumbuhan sel, kemampuan menghidrolisis pati, mendekomposisi kasein, mereduksi nitrat menjadi nitrit dan reaksi pembentukan indol [22].

Tabel 3. Hasil uji sifat-sifat biokimia sel *B. subtilis* BAC4 dan M10.

No.	Karakteristik	BAC4	M10
1.	Koloni sel	Berwarna putih agak krem	Berwarna putih-krem muda
2.	Sel	Berbentuk batang, gram positif, 1,0-1,5 μm x 2,5 - 4 μm , motil dengan flagella peritrik.	Berbentuk batang, gram positif, 0,5-1,0 μm x 1,85 – 2,5 μm , motil dengan flagella peritrik.
3.	Spora	Bulat (1-1,5 μm), sentral dengan dinding agak tebal, sporangium agak membengkak, dan beberapa spora lepas.	Elips (1 μm), sentral dengan dinding tebal bergelombang, sporangium agak membengkak, dan beberapa spora lepas.
4.	Pertumbuhan	Tidak mampu tumbuh pada suhu 65 °C, suhu pertumbuhan minimum 20 °C, mampu tumbuh anaerobik dan resisten terhadap lysozym.	Tidak mampu tumbuh pada suhu 65 °C, suhu pertumbuhan minimum 20 °C mampu tumbuh anaerobik dan resisten terhadap lysozym.
5.	Reaksi positif	Hidrolisis pati, reduksi nitrat menjadi nitrit, mendekomposisi kasein, dan menghidrolisis urea.	Katalase, hidrolisis pati, reduksi nitrat menjadi nitrit, mendekomposisi kasein, memfermentasi glukosa dan xylosa.
6.	Reaksi negatif	Katalase, <i>Voges Preskauer</i> , pada NaCl 7%, asam dari glukosa, xylosa dan manitol, dan pembentukan indol.	<i>Voges Preskauer</i> , pada NaCl 7%, dan pembentukan indol.

KESIMPULAN

Mutasi terhadap sel *B. Subtilis* BAC4 telah dilakukan dengan menggunakan larutan akridin oranye, dan memberikan mutan *B. subtilis* M10 yang memproduksi antibiotika paling baik. Sel mutan *B. subtilis* M10 memiliki karakteristik berukuran (0,5–1,0) μm x (1,85 – 2,5) μm , spora berbentuk elips dengan dinding tebal bergelombang. Di samping itu, mutan *B. subtilis* M10 juga menunjukkan reaksi positif katalase, dan pembentuk asam dari glukosa dan xylosa.

Atas hasil-hasil penelitian tersebut disarankan agar dilakukan isolasi dan pemurnian antibiotika yang diproduksi oleh mutan *B. subtilis* M10, sehingga terhadap antibiotika tersebut dapat dilakukan elusidasi struktur kimianya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh DP2M melalui hibah bersaing, untuk itu melalui kesempatan ini disampaikan terima kasih kepada Direktur DP2M Dirjen DIKTI Depdiknas RI.

DAFTAR PUSTAKA

- Petersen, P.J., Bradford, P.A., Weiss, W.J., Murphy, T.M., Sum P.E., and Projan, S.J., 2002, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 8, 2595-2601.
- Tsuji, M., Takema, M., Miwa, H., Shimada, J., and Kuwahara, S., 2003, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 8, 2507-2512.
- Griffith, D.C., Harford, L., Williams, R., Lee, V.J., and Dudley, M.N., 2003, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 1, 43-47.
- Navarro, P.G., Osso, B.Q., Ortiz, R.G., Parras, P.J., M.d.I., Puentedura, M.I.M., and Gonzalez, M.C.C., 2004, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 3, 1058-1060.
- Tsukiyama, R.I., Katsura, H., Tokuriki, N., and Kobayashi, M., 2002, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 5, 1226-1230.
- Gezer, K., Duru, M.E., Kivrak, I., Turkoglu, A., Mercan, N., Turkoglu, H., and Gulcan, S., 2006, *Afr. J. Biotechnol.*, 5, 20, 1924-1928.
- Karthikumar, S., Vigneswari, K., and Jegatheesan, K., 2007, *Sci. Res. Essays*, 2, 4, 101-104.
- Lowenberger, C., Charlet, M., Vizioli, J., Kamal, S., Richman, A., Christensen, B.M., and Bulet, P., 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 29, 20092-20097.
- Lugardon, K., Raffner, R., Goumon, Y., Corti, A., Delmas, A., Bulet, P., Aunis, D., and Boutique, M., 2000, *J. Biol. Chem.*, 275, 15, 10745-10753.
- Azevedo, E.C., Rios, E.M., Fukushima, K., and Takaki, G.M.C., 1993, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 42, 1-7.
- Phillips, I., 1999, *J. Antimicrob. Chemother.*, 44, 6, 725-728.
- Bell, R.G., 1991, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9, 10, 843-847.
- Milner, J., Silo-Suh, L., Lee, J.C., He, H., Clardy J., and Handelsman, J., 1996, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 8, 3061-3065.
- Whistler, C., Stockwell, V.O., and Loper, J.E., 2000, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 7, 2718-2725.
- Tamehiro, N., Hosoya, Y.O., Okamoto, S., Ubukata, M., Hamada, M., Naganawa, H., and Ochi, K., 2002, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 2, 315-320.
- Bernal, G., Illanes, A., and Ciampi, L., 2002, *EJB.*, 5, 1, 12-20.
- Moeis, R.M., Ratnaningsih, E., Susanto, A.H., and Liang, O.B., 2000, *A New Bacillus Strain Producing*

- Penicillin Acylase, The forth ITB-UKM Joint Seminar on Chemistry*, Yogyakarta, 75-81.
18. Kusumaningrum, H.P., 1999, *Determinasi Spesies Bacillus sp. BAC 4 Secara Mikrobiologis dan Molekuler*, Tesis Magister, Program Pascasarjana ITB Bandung, 41-66.
 19. Meevootisom, V., Somsuk, P., Prachartam, R., and Feegel, L.W., 1983, *Environ. Microb.*, 46, 1227-1229.
 20. Butcher, R.A., Schroeder, F.C., Fischbach, M.A., Straight, P.D., Kolter, R., Walsh, C.T., and Clardy, J. 2007, *PNAS.*, 104, 5, 1506-1509.
 21. Crueger, W., and Crueger, A., 1984, *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland-USA.
 22. Supartono, Wijayati, N., Herlina L., and Ratnaningsih, E., 2006, *Produksi dan Karakterisasi Antibiotika dari Bacillus subtilis BAC4 Galur Lokal Baru*, *Laporan Penelitian Hibah Bersaing*, DP2M Dirjen Dikti Depdiknas RI.Tan, K. 1998