

# ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL ANTIBIOTIK DARI TANAH SAWAH

**Fitriani\*, Lisna Meylina, Laode Rijai**

*Laboratorium Penelitian dan Pengembangan FARMAKA TROPIS Fakultas Farmasi Universitas  
Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur*

*\*email : afitri155@gmail.com*

## ABSTRAK

Salah satu habitat terbesar bakteri penghasil antibiotik adalah tanah. Tanah sawah adalah tanah yang digunakan untuk bertanam padi sawah baik secara terus-menerus sepanjang tahun maupun bergiliran dengan tanaman palawija. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik isolat bakteri yang didapatkan dari tanah sawah Samarinda dan berpotensi sebagai penghasil antibiotik. Sampel tanah sawah diambil dengan kedalaman sekitar 15 cm dari permukaan tanah. Isolasi dilakukan dengan memilih isolat yang memiliki zona bening disekitarnya apabila berdekatan dengan koloni bakteri lain. Karakterisasi dilakukan dengan pengamatan secara langsung yaitu pengamatan secara makroskopis, mikroskopis dan uji reaksi biokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 15 isolat bakteri dengan hasil makroskopis sebagian besar berbentuk *irregular*. Isolat bakteri ini diujikan terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Salah satu isolat dengan kode 2CT memiliki aktivitas terhadap *Escherichia coli* yang merupakan bakteri gram negatif dan memiliki morfologi basil.

**Kata Kunci:** Tanah Sawah, Isolat Bakteri, Antibiotik.

## ABSTRACT

*One of the biggest habitat of bacteria that producing antibiotics is soil. Rice land is the land used for cultivating rice field either continuously throughout the year or take turns with crops. This study aims to investigate the characteristics of bacterial isolates obtained from rice land in Samarinda and potential as producers of antibiotics. Rice land samples were taken at a depth of about 15 cm from the ground. Isolation bacteria by selecting the isolates that have the clear zone surrounding colonies of being close to other bacteria colony. Characterization by macroscopic, microscopic and biochemical reaction test. The results showed that there were 15 isolates with macroscopic result mostly irregular shape. The bacterial isolates were tested against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. One of the isolates with the code 2CT have activity against *Escherichia coli* which is gram-negative bacteria and morphology cocci.*

**Keywords :** Rice Land, Bacteria Isolated, Antibiotic.

## PENDAHULUAN

Sumber mikroorganisme penghasil antibiotik antara lain berasal dari tanah, air laut, lumpur, kompos, isi rumen, limbah domestik, bahan makanan busuk dan lain-lain. Namun, kebanyakan mikroba penghasil antibiotik diperoleh dari mikroba tanah. Tanah merupakan salah satu habitat bagi mikroorganisme dan dalam satu gram tanah terdapat jutaan mikroorganisme. Populasi mikroorganisme per gram tanah meliputi : bakteri

(2.500.000.000), *Actinomycetes* (700.000), fungi (400.000), algae (50.000) dan protozoa (30.000) (Budiyanto, 2004). Tanah sawah adalah tanah yang digunakan untuk bertanam padi di sawah, baik terus-menerus sepanjang tahun maupun bergiliran dengan tanaman palawija (Hardjowigeno, 2004).

Telah banyak penelitian yang dilakukan tentang mikroorganisme penghasil antibiotik. Diantaranya adalah studi biosintesis antibiotik dan aktivitas antibiotik dari jamur *Penicillium chrysogenum* (Sri *et al.* 2000), isolasi *Actinomycetes* dari tanah sawah sebagai penghasil antibiotik (Ambarwati dan Gama 2009) dan Oskay *et al* (2004) yang berhasil mengisolasi *Actinomycetes* dari tanah pertanian sebanyak 50 isolat. Tanah di Kalimantan Timur cenderung memiliki tekstur tanah gambut yaitu tanah dengan tingkat kesuburan yang rendah dan bersifat asam. Tetapi, dengan adanya sistem pengairan seperti pada tanah sawah memungkinkan adanya perubahan pada tanah, salah satunya adalah perubahan biologi tanah yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme seperti pertumbuhan bakteri penghasil antibiotik (Wahyunto, 2005)

Hal itu mendorong untuk dilakukan penelitian isolasi bakteri penghasil antibiotik dari tanah sawah di Wilayah Samarinda. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik isolat bakteri yang didapatkan dari tanah sawah Samarinda dan memiliki aktivitas sebagai penghasil antibiotik.

## **METODE PENELITIAN**

### **Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan meliputi *Laminar air flow*, oven, inkubator, *autoclave*, erlenmayer 250 mL dan 100 mL, mikropipet, tabung reaksi, vortex, ose bulat dan ose lurus, mikroskop, kaca objek, lampu bunsen, pinset, cawan petri dan rak tabung reaksi. Bahan yang digunakan meliputi Tanah sawah, Medium *Nutrient Agar*, *Methyl Red*, *Methylen Blue*, NaCl 0,9 %, Safranin, *Simon Citrate Agar*, Gelatin, *Milk Agar*, *Kliger Iron Agar*, Manitol, minyak emersi, Alkohol, Kristal Violet, *Lysine Iron Agar* dan Aquades.

### **Prosedur Kerja**

Tanah diambil pada kedalaman 10-15 cm dari permukaan tanah secara aseptik. Hal ini dilakukan untuk mengurangi adanya kontaminasi bakteri dari udara. Kontaminasi dihindari untuk mendapatkan isolat bakteri yang benar-benar berasal dari tanah.

Metode isolasi bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode tuang yaitu dengan mengambil 1 ml dari pengenceran bertingkat  $10^{-3}$  hingga  $10^{-5}$ . Kemudian masing-masing pengenceran dimasukkan ke dalam cawan petri dan ditambahkan dengan 10 mL medium *Nutrient Agar*. Selanjutnya akan diinkubasi di dalam inkubator selama 2 hari dengan suhu 37 °C. Kemudian dilakukan pemurnian mikroba dengan menumbuhkan kembali bakteri yang telah tumbuh dari hasil isolasi sebelumnya sehingga akan dihasilkan isolat-isolat bakteri yang murni. Selanjutnya, dilakukan pengamatan karakteristik berdasarkan makroskopis, mikroskopis dan uji reaksi biokimia dari isolat tersebut.

Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati bentuk dan warna dari koloni isolat bakteri. Terbagi menjadi tiga yaitu pengamatan dari atas untuk bentuk koloni secara menyeluruh, pengamatan dari atas untuk bentuk tepi koloni dan pengamatan dari samping untuk tinggi koloni.

Pengecatan gram dilakukan dengan menambahkan beberapa cat khusus untuk dapat memberikan warna terhadap bakteri. Pengecatan ini dilakukan untuk menentukan golongan bakteri termasuk gram positif atau negatif

Uji reaksi biokimia dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada medium khusus untuk mengetahui reaksi biokimia yang terjadi pada bakteri. Dilakukan 7 macam uji yaitu

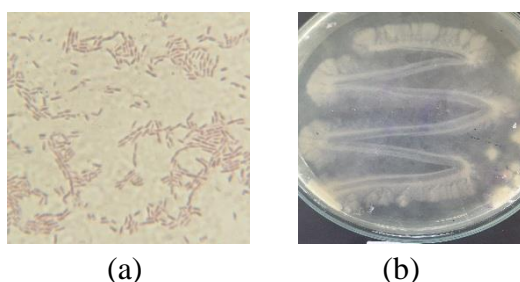
uji reaksi fermentasi karbohidrat, uji urease, uji Utilisasi Sitrat, uji Pencairan gelatin, uji *Methyl Red*, uji *Lysine Dekarboksilasi* dan uji hidrolisa Polisakarida, Protein dan Lemak .

Pengujian Terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan memasukkan biakan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* ke dalam cawan petri dengan perbandingan 1:40 sebanyak 20 mikroliter. Kemudian ditambahkan dengan *Nutrient Agar* dan digoreskan isolat di permukaan *Nutrient Agar* setelah memadat. Inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri yang diperoleh pada penelitian ini berasal dari tanah sawah. Tanah sawah yang diambil adalah tanah sawah yang telah selesai masa panen, sehingga tanah yang diambil memiliki konsistensi yang semipadat. Sampel tanah yang diambil kemudian ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* dengan terlebih dahulu membuat pengenceran bertingkat. Tujuan pembuatan pengenceran ini adalah untuk memperkecil jumlah bakteri yang akan diisolasi. Pengenceran dibuat dari pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-5}$ .

Berdasarkan teori menurut Dewi (2008), isolasi bakteri merupakan pengambilan atau memindahkan mikroba dari lingkungannya di alam dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam medium buatan. Medium yang dipilih harus sesuai dengan kebutuhan nutrisi dari bakteri yang akan diisolasi. Medium *Nutrient Agar* dipilih karena tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi bakteri secara umum.



Gambar 1. (a) Penampakan isolat ICG secara mikroskopis (b) Penampakan isolat ICT secara makroskopis

Selanjutnya bakteri yang telah ditumbuhkan dari isolasi awal kemudian dilanjutkan ke tahap pemurnian. Pemurnian isolat bertujuan untuk mendapatkan biakan murni, pada penelitian ini pemurnian isolat dilakukan sebanyak empat kali sehingga diperoleh isolat yang benar-benar murni. Berdasarkan hasil pemurnian diperoleh sebanyak 15 isolat (Tabel 1).

Pengamatan morfologi yang dilakukan terhadap 15 isolat yang telah didapatkan yaitu pengamatan morfologi secara makroskopis dan mikroskop. Pengamatan morfologi secara makroskopis meliputi bentuk koloni, bentuk tepian koloni, ukuran koloni dan warna koloni. Sedangkan pengamatan morfologi secara mikroskopis yaitu dengan pewarnaan Gram.

Pewarnaan Gram digunakan untuk mengetahui morfologi sel bakteri serta untuk membedakan bakteri gram positif dan gram negatif (Rostinawati, 2008). Perbedaan warna pada bakteri gram positif dan gram negatif menunjukkan bahwa adanya perbedaan struktur dinding sel antara kedua jenis bakteri tersebut. Bakteri gram positif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan peptidoglikan yang tebal sedangkan bakteri gram negatif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan lipid yang tinggi. Perbedaan susunan struktur dinding sel inilah yang menyebabkan adanya perbedaan warna pada saat pengamatan atau pengecatan Gram. Bakteri gram positif berwarna ungu karena kompleks zat warna kristal violet-yodium tetap dipertahankan meskipun diberi larutan pemucat aseton

alkohol sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah karena kompleks tersebut larut pada saat pemberian larutan pemucat aseton alkohol sehingga warna merah safranin dapat menempel baik pada bakteri (Lay, 1994). Salah satu hasil pengamatan pada pewarnaan Gram ditunjukkan pada Gambar 1.

Tabel 1. Hasil pengamatan isolat bakteri secara makroskopik dan mikroskopik.

No	Isolat	Bentuk Koloni	Tepian Koloni	Warna Koloni	Gram	Bentuk Sel
1.	1CT	Tidak beraturan	Lobate	Krem	Negatif	Kokus
2.	2CT	Tidak beraturan	Lobate	Putih	Negatif	Kokus
3.	3CT	Tidak beraturan	Undulate	Putih susu	Negatif	Kokus
4.	4DT	Fillamen	Filiform	Putih susu	Negatif	Basil
5.	5DT	Tidak beraturan	Serrate	Putih susu	Positif	Basil
6.	6ET	Tidak beraturan	Lobate	Putih Susu	Negatif	Basil
7.	7DT	Bulat	Entire	Kuning	Negatif	Basil
8.	9CT	Fillamen	Serrate	Putih Susu	Positif	Kokus
9.	1CG	Fillamen	Serrate	Putih Susu	Negatif	Basil
10.	2CG	Tidak beraturan	Undulate	Putih Susu	Negatif	Kokus
11.	3DG	Tidak beraturan	Lobate	Putih Susu	Negatif	Kokus
12.	4EG	Tidak beraturan	Undulate	Putih Susu	Negatif	Basil
13.	5EG	Tidak beraturan	Undulate	Putih Susu	Negatif	Basil
14.	7DG	Tidak beraturan	Lobate	Putih susu	Positif	Basil
15.	9CG	Fillamen	Filiform	Putih Susu	Negatif	Basil

Tabel 1 memperlihatkan bahwa sebanyak 4 isolat berbentuk filamen, 10 isolat berbentuk tidak beraturan dan 1 isolat berbentuk bulat. Sebagian besar isolat yang diisolasi berwarna putih susu. Sedangkan untuk pewarnaan gram sebagian besar isolat merupakan bakteri gram negatif dan tiga isolat merupakan bakteri gram positif dengan delapan isolat berbentuk basil dan tujuh isolat berbentuk kokus.

Pengamatan untuk karakteristik morfologi koloni bakteri penting dilakukan untuk mempermudah dalam proses identifikasi jenis bakteri. Hal ini sesuai dengan teori dari Lay (1994), yang menyatakan bahwa berdasarkan ciri morfologi koloni bakteri dan biakan murni maka dapat dilakukan proses identifikasi jenis-jenis mikroorganisme, namun untuk memperoleh hasil identifikasi yang lebih lengkap mengenai metabolit bakteri maka harus dilanjutkan dengan uji biokimia.

Uji biokimia yang dilakukan antara lain uji utilisasi sitrat, uji urease, uji pencairan gelatin, uji hidrolisa polisakarida, protein dan lemak, uji fermentasi karbohidrat, uji Lysine Dekarboksilasi dan uji *Methyl Red*. Hasil dari uji reaksi biokimia ditunjukkan dalam Tabel 2. dan Tabel 3. Tujuan dari pengujian-pengujian ini adalah untuk mengetahui proses reaksi

biokimia yang ada pada isolat bakteri sehingga dari data tersebut dapat dikelompokkan ke dalam genus tertentu berdasarkan ketentuan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Tabel 2. Hasil Uji Reaksi Biokimia

No.	Isolat	Utilisasi Sitrat	Urease	Pencairan Gelatin	Hidrolisa Polisakarida, Protein dan Lemak
1.	1CT	-	+	-	-
2.	2CT	-	+	+	-
3.	3CT	-	+	+	-
4.	4DT	+	+	-	-
5.	5DT	+	+	-	-
6.	6ET	-	+	-	-
7.	7DT	-	+	-	-
8.	9CT	+	+	-	-
9.	1CG	+	+	-	-
10.	2CG	+	+	+	-
11.	3DG	-	+	+	-
12.	4EG	-	+	+	-
13.	5EG	-	+	-	-
14.	7DG	+	+	+	-
15.	9CG	-	+	+	-

Keterangan : (+) = Positif / ada perubahan warna (-) = tidak ada perubahan.

Uji urease berguna untuk mengidentifikasi organisme yang mampu menghidrolisis urea yang dapat menghasilkan amonia dan karbon dioksida terutama untuk mengetahui mikroorganisme tersebut mempunyai enzim ureasi atau tidak. Pada tabel 2. menunjukkan bahwa semua isolat bakteri memiliki enzim urease tetapi tidak dapat menghidrolisis polisakarida, protein dan lemak. Uji utilisasi sitrat bertujuan mendeteksi kemampuan suatu organisme untuk memanfaatkan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Pemanfaatan sitrat melibatkan enzim citrat permease yang memecah sitrat menjadi oksaloasetat dan asetat. Perubahan ini selanjutnya akan menghasilkan pH basa dan menyebabkan perubahan warna medium dari hijau menjadi biru (Hemraj, 2013). Hasil uji menunjukkan hanya isolat 4DT, 5DT, 9CT, 1CG, 2CG dan 7DG yang dapat memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon dan energi. Sedangkan pada uji gelatin hanya isolat 2CT, 3CT, 2CG, 3DG, 4EG, 7DG dan 9CG yang dapat menguraikan gelatin. Gelatin akan terurai oleh bakteri yang mensintesis enzim proteolisis. Larutan gelatin bersifat cair pada suhu ruang atau suhu kamar dan padat apabila berada di dalam refrigerator. Apabila gelatin sudah terhidrolisis oleh mikroba, maka akan tetap bersifat cair (Hadioetomo, 1993).

Tabel 3. Hasil Uji Reaksi Biokimia

No.	Isolat	Fermentasi Karbohidrat	Lysine Dekarboksilasi	<i>Metyl Red</i>
1.	1CT	+	-	-
2.	2CT	+	-	-
3.	3CT	+	+	-
4.	4DT	+	-	-
5.	5DT	+	+	-
6.	6ET	+	+	-
7.	7DT	+	+	-
8.	9CT	+	+	-
9.	1CG	+	-	-
10.	2CG	+	-	-
11.	3DG	+	+	-
12.	4EG	+	+	-
13.	5EG	-	+	-
14.	7DG	-	-	-
15.	9CG	+	+	-

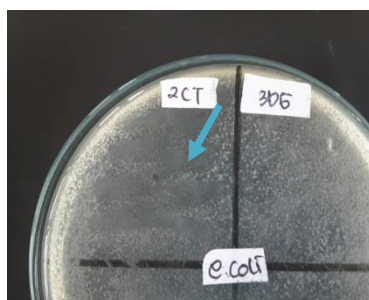
Keterangan : (+) = Positif / ada perubahan warna (-) = tidak ada perubahan.

Uji fermentasi karbohidrat adalah uji untuk mengetahui apakah bakteri memiliki kemampuan untuk memfermentasikan karbohidrat. Pada proses fermentasi, karbohidrat akan diubah bakteri menjadi asam organik seperti asam laktat, asam format atau asam asetat. Hasil menunjukkan hanya isolat 5EG dan 7DG yang tidak dapat melakukan fermentasi karbohidrat. Dekarboksilasi lisin terjadi karena bakteri tertentu dapat melakukan dekarboksilasi lisin dan menghasilkan cadaverine (pentamethylene diamine) yang bersifat basa sehingga adanya indikator BCP (*Bromo Cresol Purple*) akan berwarna ungu. Hasil menunjukkan bahwa isolat 1CT, 2CT, 4DT, 1CG, 2CG dan 7DG tidak dapat melakukan dekarboksilasi lisin. *Methyl Red* adalah uji yang digunakan untuk menentukan adanya fermentasi asam campuran. Hasil menunjukkan bahwa semua isolat tidak dapat melakukan fermentasi asam campuran.

Hasil secara makroskopis, mikroskopis dan uji reaksi biokimia yang telah didapatkan kemudian dibandingkan dengan ciri-ciri bakteri penghasil antibiotik dari tanah. Beberapa golongan bakteri penghasil antibiotik dari tanah seperti Genus *Bacillus*, *Pseudomonas* dan Genus *Micrococcus*. Apabila data yang telah didapatkan dibandingkan dengan ciri-ciri ketiga bakteri tersebut, maka diketahui dari keseluruhan isolat hanya isolat 7DT yang mendekati dengan genus *pseudomonas* yaitu dengan bentuk koloni bulat, tepi halus, berwarna krem, bentuk sel batang dan termasuk gram negatif serta uji fermentatif dan sitrat positif (Buchanan, 2003). Hasil ini hanya mendekati berdasarkan pengamatan makroskopis, mikroskopis dan uji reaksi biokimia sehingga masih terlalu umum dan perlu dilanjutkan ke uji identifikasi yang lebih untuk dapat mengetahui golongan genus atau spesies yang lebih tepat.

Pengujian aktivitas antibiotik dilakukan dengan metode difusi. Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mengetahui aktivitas isolat bakteri terhadap bakteri uji. Menurut Hugo (2004), salah satu fase hidup dari bakteri adalah fase stasioner dimana bakteri akan memproduksi metabolit guna mempertahankan diri dari bakteri lainnya karena pada fase ini mulai terjadi persaingan untuk mendapatkan nutrisi. Metabolit yang dihasilkan ini dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain yang berada di sekitar koloni. Hal ini dapat ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni tersebut.

Pengujian adanya aktivitas antibiotik dilakukan dengan membuat terlebih dahulu suspensi bakteri uji yaitu bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Kemudian suspensi tersebut dihomogenkan di dalam cawan petri bersama dengan medium *Nutrient Agar*. Selanjutnya isolat bakteri digoreskan diatas permukaan *Nutrient Agar* yang telah padat dan diinkubasi selama 24 jam di suhu 37 °C. Dari lima belas isolat yang ada, hanya isolat 2CT yang memiliki aktivitas terhadap *Escherichia coli* dan tidak ada yang memiliki aktivitas terhadap *Staphylococcus aureus*. Hasil uji ditunjukkan Gambar 2.



Gambar 2. Uji Isolat 2CT terhadap *Escherichia coli* ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar goresan isolate

Apabila dibandingkan dengan hasil identifikasi sebelumnya, seharusnya isolat 7DT dapat menghambat atau membunuh pertumbuhan dari *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* karena termasuk ke dalam genus *Pseudomonas*. Hal ini dapat terjadi kemungkinan karena metabolit yang dihasilkan oleh isolat bakteri 7DT tidak mampu menghambat atau membunuh pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Meskipun pada identifikasi awal, isolat 2CT tidak termasuk dalam genus bakteri yang dapat menghasilkan antibiotik (Genus *Bacillus*, *Pseudomonas* dan Genus *Micrococcus*) tetapi, dengan adanya hasil uji aktivitas ini menunjukkan bahwa isolat 2CT dapat dimasukkan dalam kelompok bakteri yang dapat menghasilkan zat antibiotik. Maka disarankan untuk isolat 2CT ditumbuhkan di medium-medium khusus sehingga dapat diketahui pengelompokkan bakteri yang lebih baik

## KESIMPULAN

1. Sebagian besar isolat bakteri yang telah diisolasi memiliki karakteristik berwarna putih susu, gram negatif dan berbentuk basil.
2. Isolat dengan kode 2CT memiliki aktivitas terhadap *Escherichia coli*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati, dan Gama, T. A, 2009. Isolasi Actinomycetes dari Tanah Sawah sebagai Penghasil Antibiotik. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*. Volume 10. Nomor 2.
- Buchanan, R. E and Gibbons, N. E. 2003. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Wiliam and Wilkins Company Baltimore. USA.
- Fitri, Lenni., Yasmin, Y, 2011. Isolasi dan Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Kitinolitik. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi*. Biologi Edukasi. Volume 3. Nomor 2.
- Hadioetomo, R. S, 1993. *Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium Mikrobiologi*. Gramedia. Jakarta.
- Hardjowigeno, 2004. *Klasifikasi Tanah dan Pedogenesis*. Akademika Pressindo. Jakarta.

- Hemraj, V., Diksha, S., dan Avneet, G., 2013. A Review on Commonly Used Biochemical Test for Bacteria. *Innovare Journal of Life Science*. Bhopal, India.
- Hugo, W.B dan A.D. Russel. 2004. *Pharmaceutical Microbiology*. Blackwell Scientific Publication Oxford. London.
- Lay, W. B, 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Rostinawati, T, 2008. Skrining dan Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Kitinase Dari Air Laut di Perairan Pantai Pondok Bali. *Penelitian Mandiri*. Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran Jatinangor.