



JURNAL TEKNOLOGI DAN MANAJEMEN PENGELOLAAN LABORATORIUM



Published by
UNIVERSITAS ANDALAS

Validasi *Spread Plate Method* (sebar) untuk Isolasi dan Pemurnian Bakteri Penghasil Senyawa Antibiotik dari Tanah di Kawasan Jurusan Biologi FMIPA UNSRI

Rosmania^{1*}), Winta Efrinalia¹, Ani Rahmi¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya

*) Email: rosmaniania83@gmail.com

Abstrak

Usaha untuk mendapatkan bakteri yang menghasilkan senyawa antibiotik terus menerus dilakukan, ini dikarenakan banyak antibiotik yang resisten terhadap bakteri penyebab infeksi sehingga muncul jenis bakteri yang lain yang struktur DNAnyanya sudah berubah. Metode isolasi yang digunakan untuk mendapatkan bakteri adalah *spread plate method* (sebar). Metode ini digunakan karena bakteri penghasil senyawa antibiotik yang dihasilkan ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri, sehingga mudah dilakukan pemurnian bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri penghasil senyawa antibiotik dengan teknik *spread plate method* (sebar) yang sesuai dengan *Good Laboratory Practice* untuk digunakan sebagai bahan praktikum di Laboratorium Mikrobiologi. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi isolasi dan pemurnian bakteri, uji aktivitas antibakteri, karakterisasi morfologi dan biokimia. Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa teknik isolasi dengan *spread plate method* (sebar) menghasilkan bakteri penghasil antibiotik yang baik dengan isolat bakteri terbaik yang didapat adalah isolat BA5 yang mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, memiliki karakter morfologi berbentuk iregular, gram positif, bentuk sel basil, memiliki endospora, aerob dan tidak memiliki katalase.

Kata Kunci : *Spread plate method, Antibiotik, Bakteri tanah*

I. Pendahuluan

Antibiotik merupakan golongan senyawa alami atau sintesis yang memiliki kemampuan untuk menekan atau menghentikan proses biokimia di dalam suatu organisme, khususnya proses infeksi bakteri. Substansi yang mampu menghambat pertumbuhan serta reproduksi bakteri dan fungi adalah antibiotik, dengan demikian antibiotik adalah zat yang dapat membunuh atau melemahkan suatu mikroorganisme, seperti bakteri, parasit dan jamur (Utami, 2012).

Mikroorganisme penghasil antibiotik dapat diisolasi dari tanah, air laut, lumpur, kompos, isi rumen, limbah domestik, bahan makanan busuk dan lain-lain (Sukmawati & Rosalina, 2020). Isolasi mikroorganisme adalah proses memisahkan mikroorganisme dari lingkungannya di alam, dan menumbuhkannya sebagai biakan murni (Tri et al., 2018). Salah satu sumber bakteri penghasil senyawa antibiotik adalah tanah. Menurut Panagan (2011), tanah secara alamiah terbentuk sebagai hasil dari kombinasi proses fisik, kimia dan biologi. Tanah merupakan media yang baik tempat tumbuh dan berkembangnya beranekaragam mikroorganisme

seperti bakteri. Kompleksnya nutrisi untuk pertumbuhan bakteri yang tumbuh sangat beragam.

Usaha untuk mendapatkan bakteri yang menghasilkan senyawa antibiotik terus menerus dilakukan. Hal ini dikarenakan banyak antibiotik yang resisten terhadap bakteri penyebab infeksi sehingga muncul jenis bakteri yang lain, yang struktur DNAnyanya sudah berubah. Dalam penelitian Sukmawati & Rosalina (2020), Utami (2012) mengatakan senyawa antibiotik yang dihasilkan oleh bakteri atau mikroba memiliki keunggulan dibandingkan dengan antibiotik sintetik karena memiliki sifat yang lebih efektif. Antibiotik yang dihasilkan oleh bakteri berasal dari proses metabolit sekunder sedangkan antibiotik yang dibuat dari bahan kimia atau campuran antara bahan kimia dan alami yang senyawanya memiliki efek sama dengan antibiotik alami adalah antibiotik semi sintetik atau sintetik. Untuk mendapatkan bakteri penghasil senyawa antibiotik pada tanah perlu menggunakan teknik isolasi yang baik. Menurut Pelczar & Chan, (1986) isolasi merupakan proses pemindahan mikroorganisme dari lingkungan ke medium. Ada beberapa teknik isolasi yang dapat digunakan salah satunya *spread plate method* (sebar). Metode ini

merupakan teknik isolasi bakteri dengan cara menginokulasi bakteri secara sebaran di permukaan media padat dengan bantuan alat gelas batang L untuk menyebarkan sel-sel bakteri pada permukaan medium agar. Metode ini digunakan karena bakteri penghasil antibiotik yang dihasilkan ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri, sehingga mudah dilakukan pemurnian bakteri.

Adapun yang menjadi parameter uji penelitian ini adalah isolasi dan pemurnian bakteri, uji aktivitas antibiotik dengan metode *Kirby-Baur*, karakteristik secara morfologis serta fisiologis. Oleh karena itu, untuk membuktikan metode teknik isolasi bakteri dengan *spread plate method* ini memberikan hasil yang baik untuk mendapatkan isolat bakteri dan dapat memenuhi tujuan dari pembelajaran di laboratorium, sehingga perlu dilakukan penelitian tentang teknik isolasi, dan karakteristik bakteri penghasil antibiotik pada tanah di Kawasan Jurusan Biologi FMIPA UNSRI.

II. Metode Penelitian

2.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2021 sampai dengan Oktober 2021, di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya.

2.2. Cara Kerja

2.2.1. Pengambilan Sampel

Sampel tanah diambil di kawasan jurusan Biologi FMIPA UNSRI. Jumlah lokasi tanah yang diambil ada 5 lokasi, yaitu bagian tenggara, timur, utara, barat dan bagian depan gedung jurusan biologi. Cara pengambilan sampelnya adalah tanah lapisan atas dibersihkan dahulu lalu digali tanah sampai kedalaman 15 cm. Tanah diambil dengan sendok secara aseptik dekat dengan bunsen dimasukkan kedalam beaker glass steril. Selanjutnya sampel dimasukkan kedalam *coolbox*.

2.2.2. Isolasi dan Pemurnian Bakteri dari Tanah

Isolasi dilakukan dengan cara pengenceran, sebanyak 10 g sampel tanah dimasukkan dalam 90 mL larutan fisiologis (NaCl 0,85 %) dalam erlenmeyer, kemudian dihomogenkan pakai alat vortex (10^{-1}). Dibuat seri pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-5} . Suspensi bakteri 10^{-1} diambil 1 mL dengan mikropipet lalu dimasukkan ke dalam tabung pertama (10^{-2}) yang berisi 9 mL larutan NaCl lalu divortex sampai homogen. Selanjutnya diambil 1

mL lalu dimasukkan kedalam tabung kedua (10^{-3}) divortex sampai homogen. Ini dilakukan terus sampai tabung keempat (10^{-5}). Setelah selesai pengenceran bertingkat, lalu diambil seri pengenceran 2 terakhir masing-masing diambil 100 μ L dengan mikropipet dimasukkan kedalam cawan agar lempeng yang berisi media NA (*Nutrient Agar*) padat. Lalu disebar dengan alat gelas batang segitiga sampai rata. Kemudian cawan dibungkus dengan kertas dan di inkubasi dalam inkubator secara terbalik suhu 37°C selama 1×24 jam.

Isolat bakteri penghasil senyawa antibiotik yang dihasilkan ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni bakteri. Langkah selanjutnya adalah pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan metode cawan gores. Isolat yang menghasilkan senyawa antibiotik dimurnikan dengan cara mengambil masing-masing isolat untuk kemudian dipindahkan ke medium agar NA lempeng dengan metode cawan gores. Isolat yang menunjukkan adanya pertumbuhan yang sudah murni (hanya satu jenis) adalah isolat murni, sedangkan untuk isolat yang belum murni akan dimurnikan lagi sampai didapatkan isolat murni. Setelah didapat isolat murni dibuatlah stok isolat pada medium NA miring pada tabung reaksi.

2.2.3. Pengujian Aktivitas Antibakteri

2.2.3.1. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi standar Mc Farland 0,5

Larutan asam sulfat 1 % dan larutan barium klorida 1,175 %, dibuat terlebih dahulu larutan asam sulfat 1 % dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan larutan barium klorida 1,175 % sebanyak 0,5 mL sehingga jumlah kedua larutan tersebut menjadi 10 mL, larutan sebanyak 10 mL tersebut dihomogenkan hingga menjadi keruh. Suspensi yang terbentuk berupa *Mc Farland 0,5*. Absorban diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 625 nm. Absorban yang terbaca setara dengan suspensi berisi $1,5 \times 10^8$ (Fatisa, 2013).

Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu bakteri *Escherichia coli* ATCC8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC6538. Bakteri uji dari stok yang sudah ada diremajakan di medium NA miring steril. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri diambil sebanyak satu ose lalu dilarutkan dalam 10 mL larutan NaCl 0,9 %. Suspensi bakteri yang telah dihomogenkan lalu dimasukkan kedalam kuvet sebanyak 750 μ L. Tingkat kekeruhan suspensi dibandingkan dengan standar 0,5 *Mc Farland* secara visual dan dilakukan pengukuran absorban dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm (Amalia et al., 2017).

2.2.3.2. Uji aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode *Kirby Bauer* secara difusi cakram. Medium *Mueller Hinton Agar* (MHA) dituang ke dalam cawan petri hingga medium padat. Suspensi bakteri di uji yang sudah setara dengan *Mc Farland* 0,5 diinokulasi sebanyak 0,1 mL ke cawan yang berisi medium MHA yang telah padat dengan *spread plate*. Kertas cakram diletakkan diatas medium MHA kemudian ditetesi ekstrak antibakteri sebanyak 5 µL suspensi isolat bakteri pada kertas cakram berukuran 6 mm. Media selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat (Sari et al., 2017).

2.2.4. Karakteristik Morfologi Bakteri

Isolat bakteri yang diperoleh pada tanah akan dikarakterisasi melalui beberapa tahap berikut:

2.2.4.1 Morfologi Koloni (Cappucino & Sherman, 2008)

Morfologi koloni bakteri yang diamati adalah:

- Pertumbuhan pada medium NA tegak diamati pertumbuhan pada bekas tusukan: *filiform*, *echinulate*, *bead*, *villous*, *rhizoid*, atau *arborescent*.
- Pertumbuhan pada medium NA miring diamati pertumbuhan pada bekas tusukan: *filiform*, *echinulate*, *bead*, *villous*, *rhizoid*, atau *arborescent*.
- Pertumbuhan pada medium NA lempeng diamati pertumbuhan pada bekas tusukan: *filiform*, *echinulate*, *bead*, *villous*, *rhizoid*, atau *arborescent*.

2.2.4.2. Morfologi Sel

Pengamatan morfologi sel dilakukan dengan pewarnaan gram dan pewarnaan endospora yakni sebagai berikut:

Pewarnaan Gram Bakteri

Satu ose koloni diambil secara aseptik dan diletakkan di atas kaca objek ditetesi aquadest, diratakan dan difiksasi di atas nyala api bunsen. Setelah kering ditetesi kristal violet selama 60 detik lalu dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya ditetesi larutan iodium selama 60 detik lalu dibilas dengan air mengalir lalu dikeringkan. Kemudian dilakukan pencucian dengan alkohol 95 % selama 30 detik dan dibilas dengan air mengalir. Setelah kering ditetesi safranin selama 45 detik lalu dibilas dengan air dan dikeringkan, kemudian dilakukan pengamatan dibawah mikroskop dengan pembesaran kuat. Isolat yang menunjukkan warna merah adalah indikator gram negatif dan yang berwarna ungu adalah indikator gram positif. Selain itu, di amati juga bentuk sel apakah bulat (*coccus*),

batang (*basil*), maupun bergelombang (*spiral*) (Cappucino & Sherman, 2008).

Pewarnaan Endospora Bakteri

Isolat bakteri berumur 72 jam diambil dengan ose secara aseptik dan diratakan di atas kaca objek steril lalu difiksasi. Pewarnaan dilakukan dengan menggunakan zat warna *malachite green* sampai jenuh (sekitar 2-3 menit), diletakkan diatas uap air yang mendidih, kemudian didinginkan lalu dicuci dengan aquades, lalu diberi safranin selama 30 detik dan dibilas hingga bersih. Setelah kering diamati di bawah mikroskop. Indikasi jika ada endospora maka endospora yang tampak akan berwarna hijau mengkilat di dalam sel vegetatif (Cappucino & Sherman, 2008).

2.2.5. Karakteristik Uji Biokimia

Uji Kebutuhan Oksigen Pada Medium NB

Diambil satu ose isolat bakteri dan inokulasi pada medium NB, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam, kemudian diamati bakteri yang tumbuh dengan melihat kekeruhan. Bakteri aerob akan tumbuh pada permukaan medium, bakteri anaerob akan tumbuh pada dasar medium, bakteri mikroaerofil akan tumbuh mengelompok sedikit di bawah permukaan medium, bakteri anaerob fakultatif akan tumbuh tersebar di seuruh medium (Cappucino & Sherman, 2008).

Uji Methyl Red

Diambil satu ose isolat bakteri diinokulasi pada medium *Methyl Red-Voges Proskauer* (MR-VP Broth), diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam dan diamati perubahan yang terjadi setelah ditetesi 4-7 *Methyl Red*. Indikasi uji positif jika warna medium menjadi merah, dan uji negatif diindikasikan bila medium menjadi berwarna jingga (Cappucino & Sherman, 2008).

Uji Voges Proskauer

Diambil satu ose isolat bakteri diinokulasi pada medium *Methyl Red-Voges Proskauer* (MR-VP), diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam, dan diamati perubahan yang terjadi setelah ditambahkan 10 tetes *barrit's A* dan *barrit's B*. Indikasi uji positif jika terbentuk warna merah muda pada permukaan medium, uji negatif apabila media tetap berwarna kuning (Cappucino & Sherman, 2008).

Uji Sitrat

Diambil satu ose isolat bakteri diinokulasi pada medium SC (*Simmons Citrate*) pada tabung agar miring, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam dan diamati perubahan yang terjadi. Indikasi uji positif jika terjadi perubahan medium dari hijau menjadi biru, uji negatif apabila media tetap

berwarna hijau (Cappucino & Sherman, 2008).

Uji Hidrolisis Gelatin

Disiapkan medium nutrisi gelatin pada tabung reaksi, kemudian diambil isolat bakteri dan diinokulasi pada medium yang tersedia. Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam. Kultur bakteri kemudian diletakkan pada lemari pendingin dengan suhu 4 °C selama 30 menit. Indikasi uji positif jika medium tidak berubah atau tetap cair dan uji negatif jika medium menjadi beku (Lay, 1994).

Uji Hidrolisis Urea

Medium *urea broth* disiapkan dalam tabung reaksi, kemudian diinokulasi isolat bakteri secara aseptik dan diinkubasi selama 24-48 jam dengan suhu 37 °C. Uji positif ditunjukkan dengan perubahan warna medium dari merah menjadi merah muda (Cappucino & Sherman, 2008)

Uji Hidrolisis Pati

Disiapkan medium agar pati pada cawan petri, lalu inokulasi isolat bakteri ditengah cawan petri kemudian diratakan dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam. Setelah isolat diinkubasi ditambah beberapa tetes iodine. Uji bersifat positif jika disekeliling koloni bakteri terbentuk zona bening dan menandakan terjadinya hidrolisis pati. Uji negatif jika disekeliling koloni terbentuk warna biru kehitaman (Lay, 1994).

Uji Motilitas

Diambil isolat bakteri diinokulasi secara vertikal pada medium *Semi Solid* (SS) dalam tabung reaksi, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam dan amati perubahan yang terjadi. Uji positif jika terlihat adanya garis-garis yang melebar disekitar tempat inokulasi yang merupakan petunjuk adanya motilitas bakteri, uji negatif apabila tidak terlihatnya garis-garis yang melebar disekitar tempat inokulasi (Hadioetomo, 1993).

Uji H₂S dan Pembentukan Gas

Dilakukan dengan cara menginokulasikan secara vertikal isolat bakteri kedalam medium TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) bagian yang tegak kemudian diteruskan dengan menggoreskan pada media yang miring, lalu diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37 °C dan diamati perubahan yang terjadi. Uji positif ditandai dengan terbentuknya warna hitam pada medium, sedangkan terbentuknya gas ditandai dengan pecahnya medium (Lay, 1994).

Uji Fermentasi Karbohidrat

Medium NB, *Phenol Red* disiapkan sebagai indikator pH dan gula yang akan difermentasikan, dimasukkan tabung Durham ke dalam tabung reaksi. Kemudian diinokulasi isolat murni ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 24-48 jam dengan suhu

37 °C. Indikator pembentuk asam laktat apabila terjadi perubahan warna medium merah menjadi kuning tanpa pembentukan gas pada tabung Durham. Uji akan bersifat fermentasi asam campur jika warna merah berubah dan diikuti pembentukan gas pada tabung Durham dan uji akan bersifat fermentasi alkohol apabila terbentuk gas pada tabung Durham tanpa diikuti warna medium (Lay, 1994).

Uji Katalase

Disiapkan medium agar miring dalam tabung reaksi, kemudian diinokulasikan isolat bakteri dan diinkubasi 24-48 jam pada suhu 37 °C. Setelah isolat diinkubasi ditambahkan beberapa tetes H₂O₂ 3 %. Uji positif jika terbentuk gelembung-gelembung udara pada koloni dan sekitarnya. Uji negatif apabila tidak terbentuk gelembung udara disekitar koloni bakteri (Cappucino & Sherman, 2008).

III. Hasil dan Pembahasan

3.1. Isolasi dan Pemurnian Bakteri

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil isolasi bakteri penghasil senyawa antibiotik dari tanah di kawasan Jurusan Biologi.

Tabel 3.1. Hasil isolasi dan seleksi bakteri penghasil senyawa antibiotik

Kode sampel	Jumlah isolat	Kode isolate
Sampel 1	5	BA1, BA2, BA3, BA4, BA5
Sampel 2	2	BA6, BA7
Sampel 3	2	BA8, BA9
Sampel 4	1	BA10
Sampel 5	0	0

Keterangan: BA = Bakteri Antibiotik

Berdasarkan tabel diatas isolat bakteri penghasil antibiotik yang paling banyak terdapat pada sampel 1 yang diambil pada lokasi bagian tenggara jurusan biologi yaitu 5 isolat. Sedangkan pada sampel 2 bagian timur dan sampel 3 bagian depan jurusan yaitu masing-masing 2 isolat. Pada sampel 4 bagian utara jurusan biologi ada 1 isolat dan pada bagian barat jurusan biologi tidak terdapat bakteri penghasil antibiotik. Hal ini disebabkan oleh faktor lingkungan asal masing-masing isolat bakteri yang berbeda-beda dimana pada masing-masing lokasi pengambilan sampel memiliki pH, suhu dan kelembaban tanah yang berbeda-beda. Menurut Ristiati (2015) keadaan nutrisi dalam tanah merupakan faktor penting lain yang mempengaruhi aktivitas mikroba tanah dimana jumlah dan aktivitas

mikroba tanah bergantung pada besarnya tingkat keseimbangan jumlah nutrisi.

3.2 Uji Aktivitas Antibakteri Bakteri Penghasil Senyawa Antibiotik

Data diameter zona hambat yang terbentuk dari hasil pengujian aktivitas antibiotik bakteri penghasil antibiotik disajikan dalam tabel 3.2.

yang menghasilkan luas zona bening sekitar 10 mm. Sedangkan pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menghambat pertumbuhannya sekitar 5 mm. Kemampuan antibiotik ampicilin dalam menghambat pertumbuhan bakteri berbeda, yaitu luas spektrum yang dihasilkan lebih besar terhadap bakteri *Escherichia coli*. ATCC 25922. Hal ini

Tabel 3.2. Diameter zona hambat bakteri penghasil senyawa antibiotik terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

No	Isolat bakteri penghasil antibiotik	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
		Diameter Zona Hambat (mm)	Diameter Zona Hambat (mm)
1.	Isolat BA1	0	0
2.	Isolat BA2	0	0
3.	Isolat BA3	0	0
4.	Isolat BA4	0	0
5.	Isolat BA5	2	0
6.	Isolat BA6	0	0
7.	Isolat BA7	0	0
8.	Isolat BA8	0	0
9.	Isolat BA9	0	0
10.	Isolat BA10	0	0
11.	Amphicilin	10	5

Berdasarkan tabel 3.2. hanya 1 (satu) isolat bakteri yaitu isolat BA5 yang mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang menghasilkan luas zona bening sekitar 2 mm. Sedangkan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, isolat BA5 tidak mampu menghambat pertumbuhannya dengan ciri tidak menghasilkan zona bening disekeliling kertas cakram yang ditetesi isolat bakteri. Aktivitas isolat BA1, isolat BA2, isolat BA3, isolat BA4, isolat BA6, isolat BA7, isolat BA8, isolat BA9, dan isolat BA10 tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Ini disebabkan belum terbentuknya metabolit sekunder dari isolat bakteri tersebut dalam menghasilkan antibiotik. Menurut Umar et al., (2016) produksi antibiotik dimulai pada akhir fase eksponensial dan fase stasioner. Berdasarkan waktu produksinya, antibiotik yang dihasilkan tersebut dapat digolongkan ke dalam metabolit sekunder.

Pada kontrol positif yang dipakai yaitu antibiotik ampicilin 0,1 % mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

dikarenakan setiap golongan antibiotik memiliki keefektifan yang beragam dalam melawan berbagai jenis bakteri (Utami, 2012). Oleh sebab ini, ampicillin lebih efektif membunuh bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang merupakan bakteri gram negatif.

Persentase aktivitas antibakteri bakteri penghasil antibiotik adalah pada isolat BA5 sebesar 20 % dengan keterangan lemah terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Ini dikarenakan oleh bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 merupakan bakteri gram negatif yang mempunyai susunan dinding sel yang berlapis, sehingga senyawa antibakteri yang dihasilkan bakteri penghasil antibiotik sulit untuk menembus bakteri tersebut. Dinding sel bakteri gram negatif dinding selnya berlapis tiga yang terdiri dari lipoprotein, fosfolipid, dan lipopolisakarida (Retnaningsih et al., 2019).

3.3. Karakterisasi Isolat Bakteri Penghasil Senyawa Antibiotik

Isolat bakteri penghasil senyawa antibiotik yang diperoleh sebanyak 10 isolat, akan dilakukan karakterisasi berdasarkan karakterisasi morfologi dan uji biokimia yang ditampilkan pada tabel 3.3.

Berdasarkan tabel 3.3. didapatkan hasil uji karakterisasi isolat BA1, isolat BA2, Isolat BA3 isolat BA6 dan isolat BA7 secara karakter morfologi mempunyai kemiripan yaitu pada media agar lempeng berbentuk irregular, bentuk sel basil, sifat gramnya gram positif dan memiliki endospora. Sedangkan pada karakter uji biokimia, yaitu kebutuhan oksigen sama-sama anaerob obligat. Pada uji katalase, hasil yang didapatkan negatif. Ini disebabkan oleh isolat bakteri tidak memiliki enzim katalase. Hasil ini sesuai dengan pendapat Husain & Wardhani (2021) uji katalase bermanfaat dalam membedakan bakteri anaerob aerobik dan obligat anaerob, karena anaerob umumnya diketahui tidak memiliki enzim katalase.

Tabel 3.3. Hasil karakterisasi isolat bakteri penghasil senyawa antibiotik

Karakteristik		Isolat									
		BA 1	BA 2	BA 3	BA 4	BA 5	BA 6	BA 7	BA 8	BA 9	BA 10
Uji		E	E	E	E	E	V	V	E	E	V
Morfologi	UM1										
	UM2	E	S	e	S	A	S	R	P	R	P
	UM3										
Bentuk		I	C	I	I	I	I	I	I	I	I
Elevasi		F	F	F	F	r	F	r	F	r	F
Tepian		en	U	U	U	U	U	en	U	U	U
Warna		K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Bentuk sel		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Sifat Gram		p	p	p	P	p	p	p	p	p	p
Endospora		a	a	a	A	a	a	a	a	a	a
Uji Biokimia											
	KO	AO	AO	AO	AF	ae	AO	AO	AF	AF	AF
	H ₂ S (TSIA)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Motilitas	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	Methyl red	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
	VP	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Sitrat	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-
	pati	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	Gelatin	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Katalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Indol	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	HU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	HS	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	HL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan : UM1= Koloni pada medium NA Tegak; UM2= Koloni pada medium NA Miring; UM3= Koloni pada medium NA Lempeng; KO= Kebutuhan oksigen; Vp= Voges prosekuer; E= enchilate; V= villous; S= spreading; e= echinulate; A= arborescent; R= rhizoid; P= plumose; I= irregular; C= circular; F= flate; r= raised; en= entire; U= undulate; HUK= krem; k= kuning; B= basil; p= positif; a= ada; AO= Anaerob obligat; AF= Anaerob fakultatif; ae= aerob; HU= Hidrolisis urea; HG= Hidrolisis glukosa; HS= Hidrolisis sukrosa; HL= Hidrolisis laktosa

Karakter morfologi isolat BA4, isolat BA8, Isolat BA9 dan Isolat BA10 pada media agar lempeng berbentuk irregular, bentuk sel basil, memiliki endospora dan gram positif. Bakteri gram positif adalah bakteri yang mengikat cat utama yaitu kristal violet dengan kuat, sehingga tidak dapat dilunturkan oleh peluntur yaitu alkohol dan tidak dapat diwarnai oleh cat penutup yaitu safranin dan berwarna biru ungu/violet. Menurut Putri & Kusdiyantini (2018), prinsip pewarnaan gram yaitu saat bakteri diwarnai dengan kristal violet, bakteri gram positif akan menyerap zat warna tersebut sehingga berwarna ungu. Pada karakter morfologi biokimia, memberikan hasil akan kebutuhan oksigen yaitu anaerob fakultatif. Hasil uji katalase negatif, yang dicirikan tidak terbentuk gelembung udara disekitar koloni bakteri, dimana isolat tidak memiliki enzim katalase.

Karakter morfologi isolat BA5 pada media agar lempeng berbentuk irregular, gram positif, bentuk sel basil dan memiliki endospora. Endospora dapat dilihat dengan melakukan pewarnaan endospora dengan umur isolat bakteri lebih dari 72 jam. Semua hasil pewarnaan endospora isolat bakteri penghasil senyawa antibiotik adalah memiliki endospora, dengan ciri sel spora berwarna hijau sedangkan sel vegetatif berwarna merah. Endospora banyak dimiliki oleh bakteri berbentuk basil. Ini sesuai dengan pendapat Hadioetomo (1993) yaitu endospora dimiliki oleh jenis-jenis bakteri tertentu, terutama yang tergolong kedalam genus *Bacillus* dan *Clostridium*. Pada karakter morfologi biokimia, isolat BA5 memberikan hasil akan kebutuhan oksigen yaitu aerob dengan ciri bakteri hanya tumbuh diatas permukaan medium cair. Ini dikarenakan bakteri aerob butuh oksigen. Hasil uji katalase negatif, yang dicirikan tidak terbentuk gelembung udara disekitar koloni bakteri, dimana isolat BA5 tidak memiliki enzim katalase.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil antibiotik pada tanah di kawasan Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya dapat diperoleh kesimpulan bahwa teknik isolasi bakteri dengan metode *spread plate* (sebar) adalah penghasil antibiotik yang baik dengan isolat bakteri terbaik yang didapat adalah isolat BA5 yang mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, memiliki karakter morfologi berbentuk irregular, gram positif, bentuk sel basil, memiliki endospora, aerob dan tidak memiliki katalase.

Daftar Pustaka

- Cappucino, J.G & Sherman, N. 2008. *Microbiology a laboratory Manual 6th Edition*. The Benjamin Cumming Publishing. USA. 462 pages.
- Dwijoseputro, D. 1990. *Dasar - Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Jakarta: xii + 214 hlm
- Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Hal 35-39.
- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek, Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Gramedia Pustaka. Jakarta: xi + 163.
- Hasibuan, Y.S.K., Jaya, D.K., Ansiska, P., Bria, D., & Aprianto, D. 2021. Isolasi dan Karakterisasi Mikroba Penghasil Antibiotik dari Tanaman Kecipir (*Psophocarpus Tetragonolobus*) dan Pisang (*Musa Paradisiaca*). *Jurnal Agroteknologi dan Pertanian (JURAGAN)*. 1(1):1-7
- Holt, J.G.N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.M. Staley & S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition*. Williams and Wilkins. Baltimore. USA. 787 pages.
- Husain, D.R., dan Wardhani, R. 2021. *Bakteri Endosimbion Cacing Tanah: Kajian Potensi Antibakteri Secara In-Vitro dan In-Silico*. Deepublish. Yogyakarta: xxi, 151 hlm.
- Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta: 168 hlm.
- Nursulistyarini, F., dan Ainy, E.Q. 2018. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit Penghasil Antibakteri dari Daun Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). *Seminar Nasional XI Pendidikan Biologi FKIP UNS*. 114-120
- Panagan, A. T. 2011. Isolasi Mikroba Penghasil Antibiotika dari Tanah Kampus Unsri Indralaya Menggunakan Media Ekstrak Tanah. *Jurnal Penelitian Sains*. 14(3):37-40.
- Pelczar, M. J., & Chan, E. C. S. 1986. *Dasar-dasar mikrobiologi*. UI-Press
- Pelczar, M.J., dan Chan, E.C.S. (2005). *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press. Viii+443 hlm.
- Putri, A.L.O., dan Kusdiyantini, E. 2018. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari pangan fermentasi berbasis ikan (Inasua) yang diperjualbelikan di Maluku-Indonesia. *Jurnal Biologi Tropika*. 1(2):6-12.
- Ristiati, N.P. 2015. Isolasi, Identifikasi, Bakteri penambat Nitrogen Non Simbiosis Dari Dalam Tanah. *Proceedings Seminar Nasional FMIPA UNDIKSHA V*. 230-235
- Sukmawati dan Rosalina F. 2020. Isolasi Bakteri Dari Tanah Sebagai Penghasil Senyawa.

- Biospecies*. 13(1):46-51.
- Utami, ER. 2012. Antibiotika, Resistensi, dan Rasionalitas Terapi. *Sainstis*, 1(1):124-138
- Utami, P. 2012. *Antibiotik Alami untuk Mengatasi Aneka Penyakit*. AgroMedia Pustaka. Jakarta: xii + 120 hlm.
- Wahyutomo, R. 2020. *Antibiotik: Paham Bagi Awam*. Pilar Nusantara. 37 hlm.

ISSN 2621-0878

