

JURNAL ILMIAH SAINS & TEKNOLOGI

Popy Hartatie Hardjo, Win Darmanto, Bambang Sugiharto
SKRINING TRANSFORMASI GENETIK TANAMAN TEBU (*Saccharum* spp. hybrids)
DENGAN PERANTARA *Agrobacterium tumefaciens*

Mariana Wahjudi, Lutfia Lukman Algadrie, Ruth Chrisnasari
ISOLASI BAKTERI DARI TANAH GUNUNG KAPUR DAN PENGUJIAN AKTIVITAS
ANTIBAKTERI ISOLAT TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli*
DAN *Staphylococcus aureus*

Wina Dian Savitri
UPAYA PEMBENTUKAN TUNAS ADVENTIF DARI DAUN *PHALERIA*
MACROCARPA (SCHEFF.) BOERL.

Ernest Suryadjaja
EVALUASI AWAL BUDIDAYA KAKAP PUTIH (*Lates calcarifer*)
PADA SISTEM RESIRKULASI (RAS) SKALA KECIL

Ruth Chrisnasari, Wandy Yuwono, Monika Selvira Puspitasari, Tjandra Pantjajani
OPTIMASI PEMODELAN KONSENTRASI GLUKOAMILASE DAN AMONIUM
SULFAT PADA PRODUKSI BIOETANOL DARI ONGGOK DENGAN METODE
SEPARATE HYDROLYSIS FERMENTATION (SHF) DAN SIMULTANEOUS
SACCHARIFICATION FERMENTATION (SSF)

Theresia Desy Askitosari
PRODUKSI NEMATODA PATOGEN SERANGGA SKALA LABORATORIUM HASIL
ISOLASI SAMPEL TANAH TRAWAS, MOJOKERTO

Mangihot Tua Goeltom, Tjie Kok, Dian Kumalasari
INDUKSI KULTUR KALUS DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN
ANGGREK MERPATI (*Dendrobium crumenatum* Swartz.)

Maria Goretti M. Purwanto
PERBANDINGAN ANALISA KADAR PROTEIN TERLARUT DENGAN BERBAGAI
METODE SPEKTROSKOPI UV-VISIBLE

**JURNAL ILMIAH
SAINS & TEKNOLOGI**
ISSN 0216-1540

Terbit dua kali setahun pada bulan Juni dan Desember. Berisi tulisan yang berasal dari hasil penelitian, kajian atau karya ilmiah di bidang Sains dan Teknologi.

Ketua Penyunting
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Penyunting Pelaksana
Benny Lianto
Nani Parfati

Staf Pelaksana
Tang Hamidy, Hadi Krisbiyanto, Sukono

Penerbit
Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Surabaya

Alamat Penerbit/Redaksi
Gedung Perpustakaan Lt.IV, Universitas Surabaya
Jalan Raya Kalirungkut, Surabaya, 60293
Telp. (031) 2981360, 2981365
Fax. (031) 2981373
Website : <http://lppm.ubaya.ac.id>
E-mail : lppm@ubaya.ac.id

Jurnal Ilmiah Sains dan Teknologi pernah terbit dengan nama Unitas (pertama kali terbit tahun 1992) oleh Lembaga Penelitian Universitas Surabaya.

Isi di luar tanggung jawab Percetakan.

JURNAL ILMIAH
SAINS & TEKNOLOGI

ISSN 0216-1540

Volume 7 Nomor 2, Juni 2014

Halaman 1-71

Popy Hartatie Hardjo, Win Darmanto, Bambang Sugiharto
SKRINING TRANSFORMASI GENETIK TANAMAN TEBU (*Saccharum* spp. hybrids) DENGAN
PERANTARA *Agrobacterium tumefaciens*
(hal: 16)

Mariana Wahjudi, Lutfia Lukman Algadrie, Ruth Chrisnasari
ISOLASI BAKTERI DARI TANAH GUNUNG KAPUR DAN PENGUJIAN AKTIVITAS
ANTIBAKTERI ISOLAT TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli*
DAN *Staphylococcus aureus*
(hal: 7-17)

Wina Dian Savitri
UPAYA PEMBENTUKAN TUNAS ADVENTIF DARI DAUN *PHALERIA MACROCARPA*
(SCHEFF.) BOERL.
(hal: 18-30)

Ernest Suryadjaja
EVALUASI AWAL BUDIDAYA KAKAP PUTIH (*Lates calcarifer*)
PADA SISTEM RESIRKULASI (RAS) SKALA KECIL
(hal: 31-35)

Ruth Chrisnasari, Wandy Yuwono, Monika Selvira Puspitasari, Tjandra Pantjajani
OPTIMASI PEMODELAN KONSENTRASI GLUKOAMILASE DAN AMONIUM SULFAT PADA
PRODUKSI BIOETANOL DARI ONGGOK DENGAN METODE *SEPARATE HYDROLYSIS*
FERMENTATION (SHF) DAN *SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION FERMENTATION* (SSF)
(hal: 36-45)

Theresia Desy Askitosari
PRODUKSI NEMATODA PATOGEN SERANGGA SKALA LABORATORIUM HASIL ISOLASI
SAMPel TANAH TRAWAS, MOJOKERTO
(hal: 46-51)

Mangihot Tua Goeltom, Tjie Kok, Dian Kumalasari
INDUKSI KULTUR KALUS DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN ANGGREK
MERPATI (*Dendrobium crumenatum* Swartz.)
(hal: 52-63)

Maria Goretti M. Purwanto
PERBANDINGAN ANALISA KADAR PROTEIN TERLARUT DENGAN BERBAGAI METODE
SPEKTROSKOPI *UV-VISIBLE*
(hal: 64-71)

ISOLASI BAKTERI DARI TANAH GUNUNG KAPUR DAN PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI ISOLAT TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* DAN *Staphylococcus aureus*

Mariana Wahjudi, Lutfia Lukman Algadrie, Ruth Chrisnasari

Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya

E-mail: mariana_wahyudi@staff.ubaya.ac.id

Abstract

Antibiotics are metabolites produced by microorganisms, which can kill or inhibit the growth of other microorganisms. Some bacteria have developed resistances against the antibiotics so that the common antibiotics lose its therapeutic values. Various antibiotic-producing microorganisms have been isolated in order to find new types of antibiotics from various sources, commonly from forest soils. In this research, the antibiotic-producing microorganisms had been isolated from soil of limestone mountain at Gunung Kapur, PT Semen Gresik. The antibacterial activity of each isolates was assayed against the *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by applying the supernatants into the cylinder cups. The diameters of inhibition areas around the cups were measured. Five isolates were obtained from the isolation steps. All of them had similar colonies morphologies which were white-circular colonies with entire margin during 1-2 day incubation and then became serrated. Among all of the isolates, the isolate 1 showed the largest antibacterial activity with a diameter of 1.59 ± 0.036 cm against *Staphylococcus aureus* 1.22 ± 0.017 cm against *Escherichia coli*. The characterization results showed that isolate 1 was Gram positive and rod-shaped bacterium with a centered-spore; catalase negative, amylase negative and citrate positive. It was predicted to be *Bacillus* sp.

Keywords: antibiotic producing bacteria, limestone soil, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

PENDAHULUAN

Antibiotik adalah metabolit yang dihasilkan oleh suatu organisme, yang dalam jumlah amat kecil dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain. Antibiotik dapat digunakan untuk mengatasi penyakit infeksi, dan dapat diklasifikasikan menjadi antibakteri, antijamur, anti amoeba, dan lain-lain. Penisilin merupakan antibiotika pertama yang ditemukan oleh Alexander Flemming, dan dihasilkan oleh jamur *Penicillium* (Madigan et al, 2006).

Sejak ditemukannya penisilin, antibiotika menjadi semacam peluru emas untuk mengatasi masalah infeksi yang pada masa sebelumnya menjadi salah satu penyebab

kematian utama di dunia. Hingga saat ini, berbagai antibiotika baru telah diketahui dan diproduksi secara besar-besaran, seperti klortetrasiklin, kloramfenikol, streptomisin, eritromisin, rifamisin, linkomisin, sefalosporin C, vankomisin, eritromisin dan lain-lain. Berbagai senyawa turunan penisilin juga telah dikembangkan dan disintesis (Hugo and Rusell, 1987).

Penyakit infeksi menjadi masalah yang serius di seluruh dunia. Dengan penemuan dan pengembangan berbagai antibiotika, angka mortalitas dan morbiditas dapat diturunkan. Seiring dengan produksi dan pemanfaatan antibiotika secara besar-besaran, timbul masalah baru berupa munculnya bakteri yang kebal/resisten terhadap

antibiotika yang digunakan (Singer et al, 2003; D'Agata, 2004; Spellberg, B. et al). Bakteri yang resisten, terhadap satu atau lebih golongan antibiotika, muncul lebih cepat dibandingkan penemuan antibiotika baru untuk mengatasinya, yang menimbulkan dampak merugikan pada *outcome* (Boucher, 2009), yaitu angka kematian, kerugian ekonomis dan produktivitas manusia (Cosgrove, 2006). Berkaitan hal tersebut, muncul slogan 'Bad Bugs no Drugs' (Boucher, 2009).

Mikroorganisme penghasil antibiotik umumnya adalah bakteri dan jamur, seperti *Micromonospora*, *Streptomyces*, Actinomycetes dan *Bacillus* (Crueger, 1984). Antibiotik *novel* diperoleh dari mikroorganisme yang diisolasi dari berbagai habitat, seperti sungai (Tawiah et al, 2012), danau Amazon (Brandelli et al, 2004) dan dari berbagai macam tanah (Dhanajeyan et al, 2010; Nanjwade et al, 2010; Chandrashekhara, 2010) serta habitat lainnya.

Antibiotik paling banyak dihasilkan dari golongan Actinomycetes, namun di tanah yang mendapatkan aerasi cukup, bakteri dan fungi akan lebih dominan tumbuh dibandingkan Actinomycetes. Juga di lingkungan tanah yang mengandung sedikit atau tanpa oksigen, bakteri berperan terhadap hampir semua perubahan biologis dan kimia lingkungan tanah (Madigan et al, 2006). Bakteri penghasil antibiotik yang terutama adalah dari spesies *Bacillus* (basitrasin, polimiksin, sirkulin), selain itu juga dari spesies *Pseudomonas (piousianin)*, *Chromobacterium* dan sebagainya (Basavaraj et al, 2010).

Dalam usaha mencari bakteri penghasil antibiotic yang memiliki karakter yang spesifik, pada penelitian ini dilakukan isolasi mikroorganisme penghasil antibiotika dari tanah kapur. Umumnya, isolate mikroorganisme penghasil antibiotic di dapat dari sumber yang memiliki pH netral hingga asam. Selama ini sangat sedikit atau bahkan belum ada penelitian yang menyebutkan adanya isolate yang diambil dari daerah dengan pH basa.

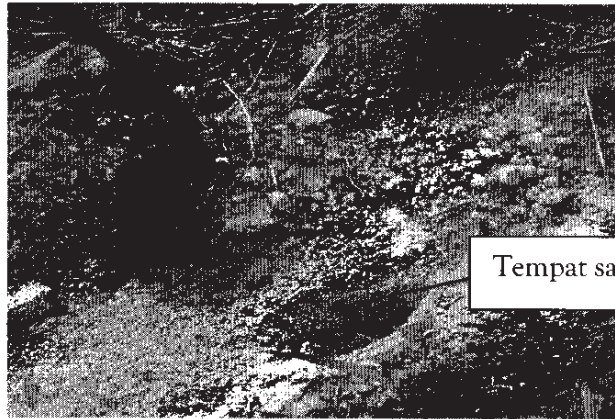
Berdasarkan hal di atas, maka penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi mikroorganisme, terutama bakteri penghasil antibiotika dari tanah kapur (daerah gunung kapur PT. Semen Gresik), menguji aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Bahan dan Metode Penelitian

Bahan Penelitian

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini antara lain adalah etanol absolut (pro teknis), H₂SO₄ pekat (Merck p.a), NaCl (Merck p.a), larutan-larutan pewarna Gram, larutan *Malachite-green* dan larutan fuchsin basa; kloramfenikol dan tetrasiklin (PT. Brataco). Sedangkan Media yang digunakan ialah Nutrien Agar (NA) (E.Merck), Nutrien broth (NB) (E.Merck), Simmon's Citrate Agar (SCA), Antibiotik Medium I (AMI) (E.Merck).

Untuk uji antibakteri, digunakan bakteriuji *E. coli* ATCC 25922 dan *S. aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya.



Gambar 1 Area Tempat Pengambilan Sampel

METODE KERJA

Isolasi bakteri penghasil antibiotik

Isolasi bakteri dilakukan dengan cara sebagai berikut: sampel tanah diambil dari tanah kapur dari gunung kapur PT Semen Gresik (Gambar 1). Lokasi pengambilan sampel dipilih area tanah kapur yang ditumbuhi tanaman. Tanaman ditarik terlebih dahulu kemudian tanah diambil dari permukaan sampai kedalaman 15 cm. Sampel tanah disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,85% steril dan diencerkan dengan larutan yang sama sebelum disebar di permukaan medium NA dan diinkubasi selama 1-2 hari pada suhu 37°C. Koloni bakteri penghasil antibiotik akan tumbuh membentuk zona bening di antara koloni-koloni bakteri tanah lainnya.

Koloni yang membentuk zona bening pada tahap seleksi ini kemudian dimurnikan dengan cara gores ulang pada permukaan medium NA. Kultur diinkubasi selama 1-2 hari pada suhu 37°C. Masing-masing isolat murni dipindahkan dan digunakan untuk tahap pengujian selanjutnya.

Skrining Aktivitas Antibakteri Isolat

Skrining kemampuan isolat menghasilkan senyawa antibakteri dilakukan dengan cara menggoreskan isolat pada

medium AMI kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 jam. Tahap ini dilakukan untuk memberi kesempatan isolat menghasilkan metabolit sekunder, termasuk antibiotika, terlebih dahulu. Kemudian bakteri uji digoreskan tegak lurus di ujung goresan isolat yang tumbuh, pada sisi kanan digoreskan bakteri *S. aureus* dan sisi kiri bakteri *E. coli*. Masing-masing dengan jarak 2 mm dari ujung isolat. Inkubasi dilanjutkan pada suhu 37°C selama 20 jam. Keberadaan metabolit sekunder yang mempunyai daya antibiotik dapat dilihat dengan keberadaan zona bening di sekitar koloni yang berdekatan dengan isolat-isolat tersebut.

Isolat yang menunjukkan penghambatan terhadap bakteri uji terbesar, ditandai dengan zona bening terlebar, dipilih untuk tahap pengujian selanjutnya.

Pengukuran aktivitas antibakteri oleh Isolat terpilih pada berbagai fase pertumbuhan isolat

Pengujian kemampuan isolat menghasilkan senyawa antibakteri diawali dengan mengamati aktivitas antibakteri isolat pada beberapa fase pertumbuhannya. Hasil penentuan waktu optimum produksi metabolit ini digunakan sebagai acuan untuk memperkirakan waktu panen isolat yang lain.

Isolat yang dipilih untuk tahap ini adalah isolat yang memberikan aktivitas antibakteri terbesar pada tahap sebelumnya. Pengukuran kurva pertumbuhan dan skrining aktivitas antibakteri isolat dilakukan pada medium NB pada suhu 37°C, 120 rpm selama 60 jam. Pengukuran pertumbuhan ditentukan dengan OD₅₈₀. Sampel diambil tiap 2 jam untuk diukur densitas sel pada OD₅₈₀. Supernatan kultur dipisahkan dari selnya untuk diuji daya antibakterinya, dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C (USP, 2005)

Supernatan dari kultur isolat pada berbagai fase pertumbuhan diuji daya antibakterinya dengan metode difusi agar menggunakan *cylinder cup* terhadap bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus*. Aktivitas antibakteri ditentukan berdasarkan pengukuran diameter daerah hambatan pertumbuhan bakteri uji, yang ditandai dengan adanya daerah/zona bening disekitar *cylinder cup*.

Pengujian aktivitas antibakteri isolat-isolat terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*

Pengujian aktivitas antibakteri isolat-isolat dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan *cylinder cup* pada medium AM1, terhadap bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus* (USP 29, 2007).

Sampel supernatan masing-masing diisikan ke dalam *cylinder cup* sebanyak 100 µl. Sebagai kontrol negatif digunakan medium NB, sedangkan untuk kontrol positif terhadap bakteri uji *E. coli* digunakan larutan kloramfenikol dengan kadar 0,1 mg/ml dan untuk kontrol positif terhadap bakteri uji *S. aureus* digunakan tetrasiklin 0,05 mg/ml. Petri uji diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengukuran dan penentuan aktivitas antibakteri dilakukan sama seperti cara sebelumnya.

Karakterisasi Isolat

Karakterisasi dilakukan untuk isolat yang mempunyai aktivitas antibakteri terbesar, yang meliputi pengamatan makroskopik koloni, sifat Gram, pembentukan spora, uji katalase, uji amilase, dan uji sitrat.

HASIL DAN BAHASAN

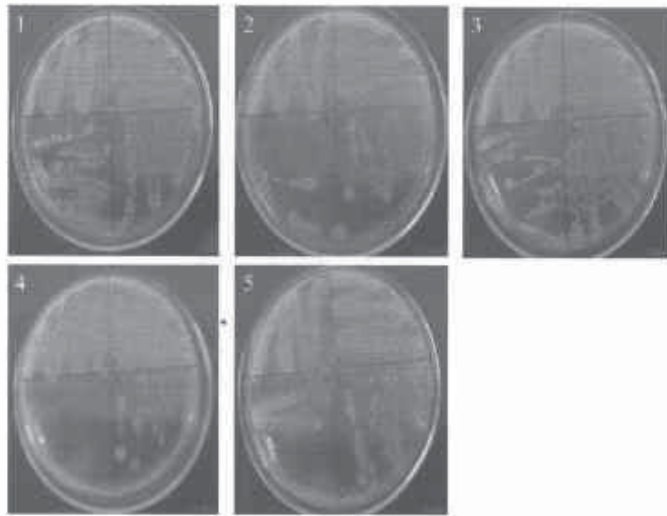
Isolasi bakteri dari tanah gunung kapur telah dilakukan. Pada penelitian ini sampel tanah sumber isolat bakteri penghasil antibiotik diambil dari kedalaman 15 cm dari permukaan tanah kapur di daerah gunung kapur PT Semen Gresik. Sampel tanah diambil dari daerah perakaran tumbuh dengan asumsi ada sumber karbon dan nutrisi yang mencukupi untuk pertumbuhan bakteri tanah. Jika pada tanah kapur tersebut terdapat tanaman yang mampu hidup, maka dalam tanah kapur tersebut kemungkinan terdapat mikroorganisme yang berperan membantu proses penyerapan nutrisi dan bahan organik lainnya oleh tanaman. Skrining dilakukan pada medium NA.

Mikroorganisme penghasil antibiotik tumbuh pada medium NA dan membentuk zona bening disekelilingnya, di antara koloni-koloni bakteri yang tumbuh di sekitarnya. Pembentukan zona bening ini disebabkan karena mikroorganisme tersebut mempertahankan keberadaannya di habitatnya dengan cara mengeluarkan senyawa metabolit sekunder (termasuk antibakteri) yang akan didifusikan ke sekelilingnya, sehingga mikroorganisme disekitarnya tidak dapat tumbuh. Terbentuknya zona bening mengindikasikan bahwa terdapat penekanan pertumbuhan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba.

Koloni-koloni yang menunjukkan penghambatan pada mikroorganisme di sekitarnya kemudian dimurnikan. Dari hasil pemurnian didapat 5 isolat bakteri murni

(Gambar 2). Kelima isolat tersebut kemudian digunakan untuk tahap uji konfirmasi

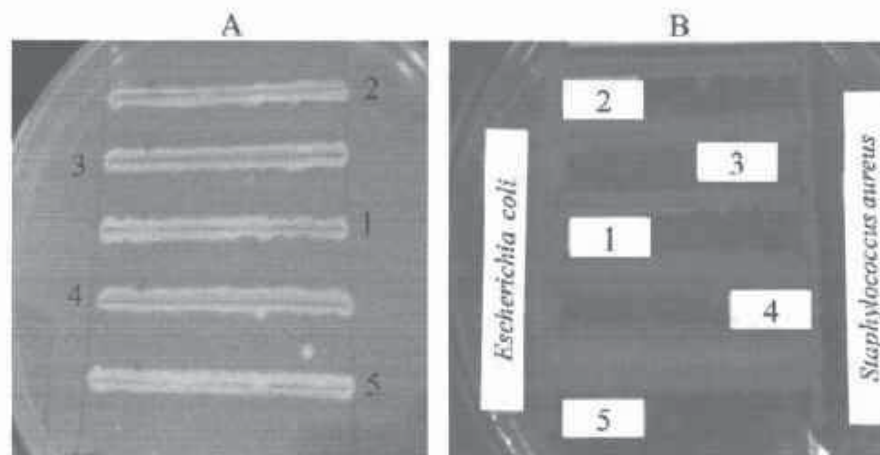
mengenai kemampuannya menghasilkan metabolit antibakteri.



Gambar 2. Isolat-isolat bakteri dari tanah gunung kapur pada Media *Nutrient Agar*.

Hasil skrining aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa semua isolat menunjukkan adanya aktivitas antibakteri setidaknya terhadap salah satu bakteri uji Gambar 3. Penghambatan yang ditunjukkan oleh masing-masing isolat terhadap kedua

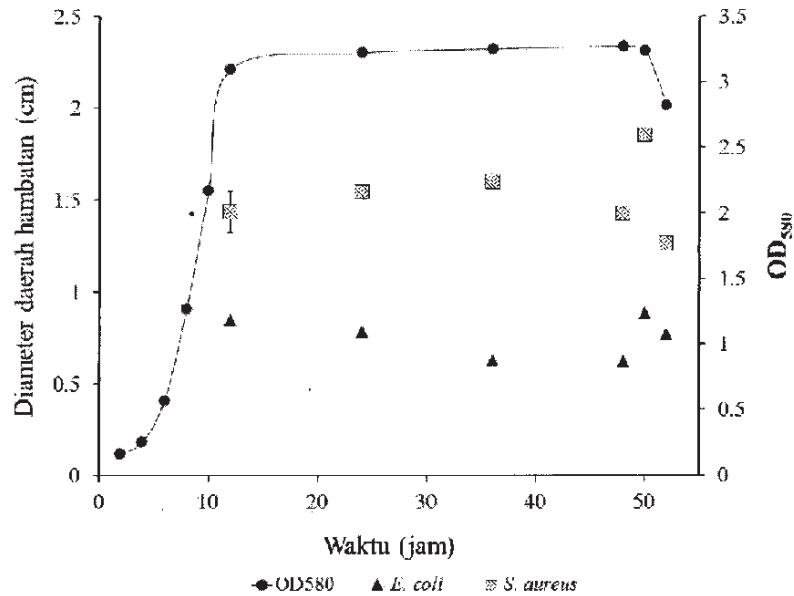
bakteri uji berbeda. Isolat no 1 terlihat mampu menghambat pertumbuhan kedua bakteri uji lebih besar dibandingkan isolat-isolat lainnya. Pengujian ini telah dilakukan sebanyak 4 kali dengan hasil yang sama.



Gambar 3. Skrining kemampuan isolat menghambat pertumbuhan bakteri uji, pada médium Antibiotik AM1. Isolat ditumbuhkan 24 jam (A) sebelum penggoresan bakteri uji *E.coli* dan *S.aureus* pada sisi kiri dan kanan isolat (B).

Pada tahap selanjutnya dilakukan uji antibakteri isolat-isolat terhadap kedua bakteri uji. Sebelumnya dilakukan pengujian daya hambat kultur isolat, yang diwakili oleh

Isolat1, pada beberapa waktu sampling selama fase stationer untuk menentukan waktu panen kultur.

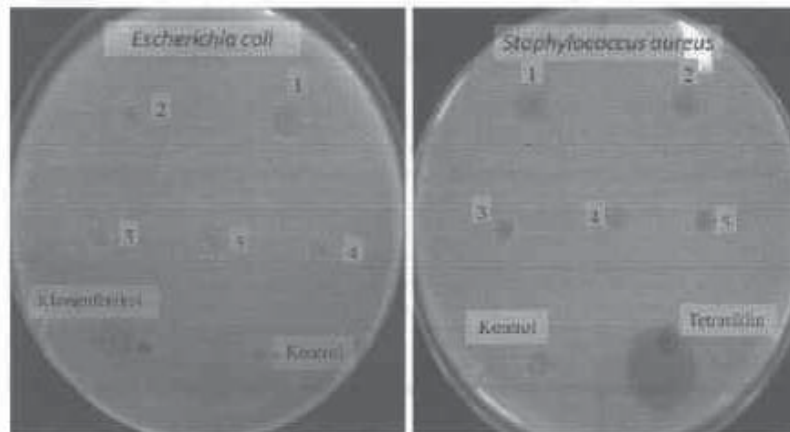
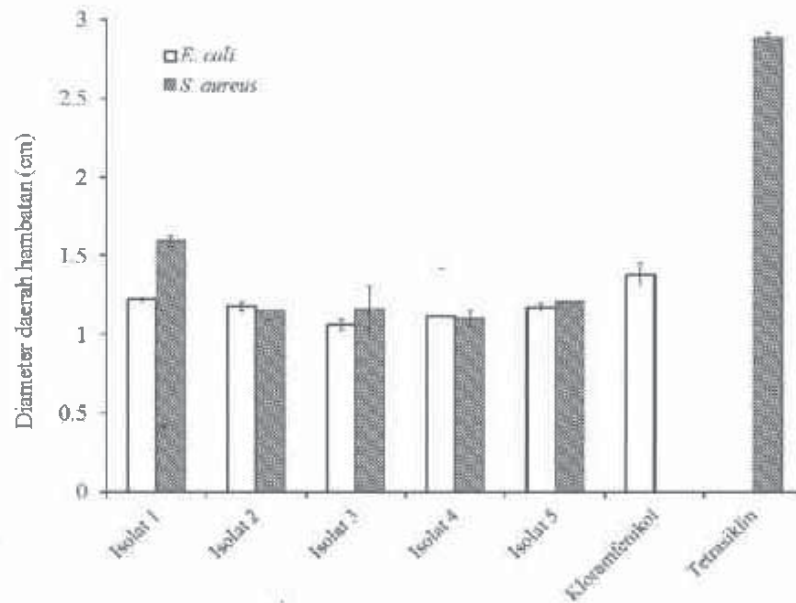


Gambar 4 Kurva pertumbuhan Isolate1 pada medium NB (●) dan aktivitas antibakteri kultur terhadap bakteri uji *E. coli* (▲) dan *S. aureus* (◻).

Pada kurva pertumbuhan terlihat bahwa kultur Isolat1 mencapai fase stationer pada medium NB setelah inkubasi 12 jam (Gambar 4). Supernatan dari kultur 12 jam, 24 jam, 36 jam, 48 jam, 50 jam dan 52 jam diuji aktivitas antimikrobanya dengan metode *cylinder cup* terhadap bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa kultur selama fase stationer mempunyai aktivitas antibakteri terhadap kedua bakteri uji, dengan penghambatan yang kurang lebih sama. Maka untuk tahap selanjutnya, pengujian aktivitas antibakteri kelima isolat dilakukan dengan cara yang sama seperti tahap sebelumnya, selama 50 jam untuk memberi kesempatan produksi antibiotika terbesar. Hal ini sesuai dengan teori, bahwa

bakteri secara umum, pada fase stationer mengalami penumpukan racun akibat metabolisme sel sedangkan kandungan nutrisi mulai habis, akibatnya terjadi kompetisi nutrisi yang menyebabkan beberapa sel mati dan lainnya tetap tumbuh (Madigan *et al*, 2006). Pada fase inilah bakteri produsen akan menghasilkan antibiotika untuk memenangkan persaingan dengan menghambat/membunuh mikroorganisme lain dalam habitatnya.

Pengujian aktivitas antibakteri kelima isolat yang ditumbuhkan pada medium NB menunjukkan bahwa Isolat1 memberikan hambatan terbesar terhadap pertumbuhan *E. coli* (1.22 cm) dan *S. aureus* (1.59 cm) dibandingkan isolat lainnya (Gambar 5).



Gambar 5 Penghambatan bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus* oleh supernatan isolat-isolat hasil kultivasi selama 50 jam pada media *Nutrient Broth* 37°C, 120 rpm.

Hasil pengukuran diameter daerah hambatan oleh isolat ini menguatkan hasil uji konfirmasi sebelumnya bahwa Isolat1 memberikan hambatan paling besar. Daya hambat Isolat1 terhadap kedua bakteri uji tersebut tidak sebesar aktivitas antibiotika standar kloramfenikol (1.38 cm) dan tetrasiklin (2.88 cm), walaupun jika dibandingkan dengan isolat lainnya Isolat1 mempunyai daerah hambatan yang terbesar.

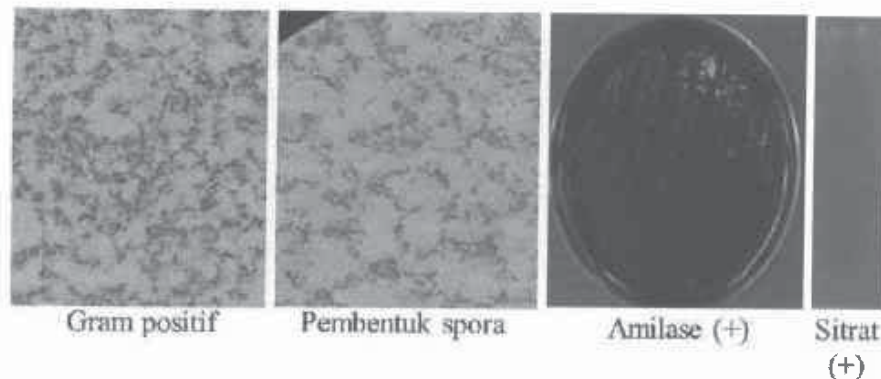
Hal ini kemungkinan disebabkan karena kadar senyawa yang berperan sebagai antimikroba di dalam supernatan rendah. Bila diperhatikan bahwa dengan supernatan kultur saja bisa memberikan hambatan pertumbuhan pada bakteri uji, kemungkinan dengan pemekatan akan didapat aktivitas yang lebih besar. Selain itu, produksi antibiotika umumnya dilakukan pada medium produksi khusus. Isolate diisolasi dari tanah gunung

kapur yang tentunya memiliki pH alkalis. Kemungkinan isolate beradaptasi dengan baik pada pH alkalis, bahkan pH optimal pada pH tinggi. Umumnya golongan Actinomycetes tumbuh baik dan menghasilkan antibiotik pada pH netral hingga alkalis (Nanjwade et al, 2010). Dengan demikian, penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengoptimasi kondisi dan media kultivasi untuk mendapatkan senyawa antimikroba tersebut dalam jumlah maksimal, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengoptimasi kondisi fermentasi untuk mendukung produksi senyawa antibakteri tersebut.

Untuk mengetahui klasifikasi bakteri Isolat1, dilakukan karakterisasi Isolat1

berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al, 1994). Karakterisasi yang dilakukan meliputi pengamatan makroskopik, pewarnaan Gram, pewarnaan spora dan beberapa uji biokimia. Pengamatan makroskopik koloni Isolat1 menunjukkan bahwa koloni Isolat1 berwarna putih tulang, keruh, bentuk bulat, tepi rata (biakan muda) dan bergerigi (koloni tua), dengan konsistensi basah dan elevasi timbul (Gambar 2).

Hasil pewarnaan menunjukkan bahwa Isolat1 adalah Gram positif yang berbentuk basil tunggal (soliter), membentuk spora center pada sel vegetatifnya. Hasil pewarnaan Gram dan pewarnaan spora dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Hasil karakterisasi Isolat1 dengan pewarnaan Gram dan spora, uji amilase dan peruraian sitrat.

Karakterisasi Isolat1 berdasarkan kunci identifikasi *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, menunjukkan bahwa Isolat1 kemungkinan besar adalah *Bacillus sp.* Uji biokimiawi menunjukkan bahwa Isolat1 menghasilkan amilase (*Starch Hydrolysis*), media amylum kultur berwarna biru tua tanpa zona bening setelah penambahan larutan iodine. Warna biru tua timbul karena adanya reaksi antara pati dengan iodine yang menghasilkan kompleks berwarna biru tersebut, sedangkan pada media di sekitar koloni terdapat daerah jernih. Uji katalase menunjukkan hasil negatif, tidak terbentuk

gelembung udara pada biakan setelah penambahan hidrogen peroksida. Sedangkan dari penanaman Isolat1 pada agar miring SCA, menunjukkan hasil positif, yang ditunjukkan dengan berubahnya media dari warna hijau menjadi biru (Gambar 6 dan Tabel). Perubahan warna ini disebabkan karena sitrat diuraikan menghasilkan produk alkalis yang menyebabkan indikator *bromthymol blue* (hijau pada pH < 7) berubah warna menjadi biru, sehingga dapat dikatakan bahwa bakteri ini mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal (Cappuccino, J.G., Sherman. 2005).

Tabel Hasil Karakterisasi Isolat 1

Parameter	Hasil
Pewarnaan Gram	Gram positif (berbentuk <i>bacil</i>)
Pewarnaan spora	Berspora (central spora)
Uji amilase	positif
Uji katalase	Negatif
Uji sitrat	Positif

Dari serangkaian proses karakterisasi dan identifikasi, kemungkinan Isolat 1 tersebut adalah *Bacillus sp.* Tetapi bila dilakukan penelusuran kembali berdasarkan sifat-sifat bakteri *Bacillus sp.* ternyata ada beberapa hasil yang tidak sesuai, misalnya *Bacillus* pada umumnya menghasilkan amylase. Untuk itu, perlu dilakukan karakterisasi dan identifikasi lanjutan untuk memastikan klasifikasi Isolat 1 tersebut.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa proses isolasi mikroorganisme penghasil antibiotik dari tanah gunung kapur PT Semen Gresik telah berhasil dilakukan, didapatkan 5 isolat bakteri. Semua isolat menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S.*

aureus, tetapi hanya Isolat 1 yang mempunyai aktivitas antibakteri *E. coli*. Dari 5 isolat tersebut, Isolat 1 menunjukkan aktivitas antibakteri terbesar yaitu dengan diameter daerah hambatan 1.59 ± 0.036 cm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan 1.22 ± 0.017 cm terhadap bakteri *Escherichia coli*. Isolat 1 diduga adalah *Bacillus sp.* dengan ciri-ciri sebagai berikut bakteri Gram positif berbentuk basil soliter, berspora sentral, amilase negatif, katalase negatif dan sitrat positif.

Disarankan penelitian lanjut untuk mengetahui secara tepat klasifikasi Isolat 1, dan perlu dilakukan optimasi kondisi pertumbuhan untuk produksi senyawa antimikroba dan penentuan tipe senyawa yang berperan sebagai antimikroba oleh Isolat 1 tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Boucher, H. W., Talbot GH., Bradley JS., Edwards JE., Gilbert D., Gilbert D., Rice LB., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1-12.
- Brandelli A, Cladera-Olivera F, Motta SA. 2004. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon Basin. *Braz J Microbiol*, 35, 307-310.
- Chandrashekhara, S. 2010. Isolation and characterization of antibiotic production from soil isolates by fermentation. Thesis doctoral. VINAYAKA MISSIONS UNIVERSITY, SALEM, TAMILNADU, INDIA.
- Cosgrove, S. E. 2006. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin. Infect. Dis.* 42 Suppl 2, S82-9.
- Crueger, H. 1984. *Biology*. 5th ed. New York: Worth Publisher, Inc.
- D'Agata, E. M. 2004. Rapidly rising prevalence of nosocomial multidrug-resistant, Gram-negative bacilli: a 9-year surveillance study. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*, 25, 842-846.
- Dhanajeyan, V., N. Selvan and K. Dhanapal. 2010. Isolation, Characterization, screening and antibiotic sensitivity of Actinomycetes from locally (Near MCAS) collected Soil samples. *J. Biol. Sci.* 10 (6), 514-519
- Holmberg, S. D., Solomon, S. L. & Blake, P. A. 1987. Health and economic impacts of antimicrobial resistance. *Rev. Infect. Dis.* 9, 1065-1078.
- Holt. J.G., N.R. Krieg, R.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Baltimore: Williams & A Welters Kluwer Company.
- Hugo and Rusell. 1987. *Principle and Processes Antibiotic*. 7th ed. Southbank: Thomson & Brooks/Cole.
- Kalyani, A.L.T^a, Ramya Sravani K. M^a, Annapurna, J. 2012. Isolation and characterization of antibiotic producing actinomycetes from marine soil samples. *Int J Curr Pharm Res*, 4(2), 109-112.
- Madigan MT, Martinko JM, and Parker J. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*. International Edition, 11th. United States of America: Prentice Hall Pearson Education Inc.
- Nanjwade, B.K., S. Chandrashekhara, A.M Shamarez, P.S. Goudanavar and F.M. Manvi. 2010. Isolation and Morphological Characterization of Antibiotic Producing Actinomycetes. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9 (3), 231-236
- Singer RS, Finch R, Wegener HC, Bywater R, Walters J, Lipsitch M. 2003. Antibiotic resistance – the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *The Lancet infectious disease*, 3(1), 47-51

- Spellberg, B., Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, Bartlett JG, Edwards J Jr. 2008. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*46, 155-164.
- Tawiah, A.A., S.Y. Gbedema, F. Adu, Vivian E Boamah and K. Annan. Antibiotic producing microorganisms from River Wiwi, Lake Bosomtwe and the Gulf of Guinea at Doakor Sea Beach, Ghana. *BMC Microbiology* 2012, 12:234
- Tortora G.J, Funke B.R, Case C.L. 2001. *Microbiology an Introduction*. 7th ed. San Fransisco: Addison Wesley Longman Inc.
- Cappuccino, J.G., and Sherman. 2005. *Microbiology a Laboratory Manual*. San Francisco: Benjamin Cummings..
- United States Pharmacopeia, 2007. Volume 29.