

HASIL PENELITIAN

Isolasi Mikroba Tanah Penghasil Antibiotika dan Sampel Tanah pada Lokasi Penumpukan Sampah

Akmal, Helmi Arifin, Armeiny Romita

Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan ilmu Pen getahuan Alam Universitas Andalas, Padang

ABSTRAK

Telah dilakukan isolasi mikroba tanah penghasil antibiotika dan sampel tanah pada lokasi penumpukan akhir sarnpah kota di Koto Tengah, Kotamadya Padang. Isolasi dilakukan dengan cara membiakkan mikroba dalam medium perbenihan *Potato Dextrose Agar* dan *Nutrient Agar*. Selama masa inkubasi diamati adanya koloni mikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain di sekelilingnya. Koloni tersebut dipisahkan, dimurnikan, diidentifikasi dan diuji aktifitasnya terhadap beberapa mikroba indikator.

Dan percobaan diperoleh 10 spesies mikroba penghasil antibiotika, terdiri dari: sembilan spesies dari golongan bakteri dan satu spesies dari golongan jamur. Uji aktifitasnya menunjukkan bahwa, delapan spesies aktif terhadap *Bacillus subtilis*, sembilan spesies terhadap *Enterobacter Sp* dan satu spesies terhadap *Aspergillus niger*.

PENDAHULUAN

Di Indonesia penyakit infeksi sampai sekarang masih menduduki urutan teratas dalam hal penyebarannya, sehingga dibutuhkan biaya penanggulangan yang relatif besar terutama untuk pengadaan obat-obatan dan golongan antibiotika^(1,2). Dana yang harus dikeluarkan oleh Pemerintah Indonesia untuk mengimpor bahan baku antibiotika setiap tahunnya berkisar antara Rp 81,6 – Rp 122,4 miliar⁽²⁾.

Sementara itu negara maju seperti: Inggris, Amerika Serikat, Jerman dan Jepang berlomba-lomba melakukan penelitian yang intensif untuk pengadaan bahan baku antibiotika. Dilaporkan bahwa hampir semua antibiotika yang telah ditemukan saat ini dihasilkan oleh mikroba tanah, yaitu dan golongan bakteri, jamur dan actinomycetes^(3,4). Pada tahun 1963 sudah ditemukan

511 jenis antibiotika dan pada tahun 1974 meningkat tajam menjadi 4.006 jenis dan hingga saat ini diperkirakan sudah ditemukan lebih dari 6.000 jenis antibiotika⁽¹⁾.

Indonesia dengan iklim tropis dan urah hujan yang cukup tinggi, merupakan tempat yang cocok bagi pertumbuhan dan perkembangbiakan berbagai mikroorganisme tanah. Akan tetapi sampai saat ini penelitian yang dilakukan untuk menemukan mikroba tanah yang dapat menghasilkan antibiotika masih sangat kurang⁽⁴⁾. Bertitik tolak dan kenyataan di atas dan untuk mengurangi ketergantungan Indonesia terhadap negara lain dalam penyediaan bahan baku antibiotika, sudah saatnya kita memikirkan dan melakukan penelitian-penelitian dasar untuk memanfaatkan kekayaan alam kita sendiri. Langkah awal yang dapat dilakukan yaitu penapisan mikroba tanah penghasil anti-

biotika dan berbagai sampel tanah di berbagai tempat di tanah air.

Pada lokasi penumpukan sampah, banyak tertimbun daun-daun dan hewan-hewan yang mati serta berbagai sisai bahan organik lainnya. Di dalam tanah mikroba berperan sebagai dekomposer berbagai bahan organik tersebut; semakin padat populasi mikroba dalam suatu habitat maka semakin cepat pula proses dekomposisinya. Untuk mempertahankan din dan serangan mikroorganisme lain, suatu mikroba dapat menghasilkan zat toksis yang dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme pengganggu tersebut (sifat antagonisme). Zat toksis yang dihasilkan tersebut dikenal dengan antibiotika^(5,6).

Pada penelitian ini telah dilakukan percobaan pendahuluan isolasi mikroba tanah penghasil antibiotika dari sampel tanah pada lokasi penumpukan akhir sampah kota, di Kota Tengah Kotamadya Padang. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat murni mikroba penghasil antibiotika, yang berguna bagi penelitian lanjutan untuk memperoleh bahan baku antibiotika ataupun antibiotika baru melalui proses fermentasi yang dapat dimanfaatkan untuk pengobatan.

METODOLOGI

1) Pengambilan Sampel

Sampel diambil secara acak pada 30 tempat di lokasi penumpukan akhir sampah kota, di Kota Tengah Kotamadya Padang. Masing-masing tempat diambil tiga sampel dengan kedalaman 10–15 cm dari permukaan tanah.

2) Pemiakan Mikroba dalam Medium Perbenihan

Sampel tanah dan masing-masing tempat, dicampur dan diaduk merata. Ditimbang sebanyak 10 gram, diencerkan dengan larutan natrium klorida 0,9% steril hingga diperoleh konsentrasi 1:10 sampai 1:10.000. Sebanyak satu mililiter dan masing-masing enceran sampel, dituangkan ke dalam cawan petri yang telah berisi medium perbenihan *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan Nutrient Agar (NA). Inkubasi pada suhu 25–30°C selama 2–7 hari.

3) Seleksi Biakan

Selama masa inkubasi, perubahan yang terjadi diamati setiap harinya. Mikroba yang tumbuh dan dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain di sekelilingnya dipindahkan ke dalam media-agar lain dan diinkubasi selama 2–5 hari. Perlakuan ini dilakukan berulang-ulang sehingga diperoleh isolat mikroba yang murni.

4) Pengamatan Morfologi dan Identifikasi

Biakan murni mikroba yang telah diperoleh, diamati morfologinya di bawah mikroskop dan identifikasi dengan beberapa reaksi tertentu yaitu: pewarnaan Gram, reaksi biokimia dalam medium Triple Sugar Iron Agar (TSIA), reaksi Simon Sitrat dan pengamatan motilitasnya.

5) Uji Aktifitas Antibiotika

Biakan murni mikroba penghasil antibiotika yang telah diisolasi, diinkubasi pada medium cair Nutrient Broth selama 7 hari. Pada akhir masa inkubasi, diuji aktifitasnya terhadap bebe-

rapa mikroba indikator dengan metode difusi agar menggunakan cakram kertas. Dibuat inokulum mikroba indikator 3% (v/v), dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Pada permukaan agar-inokulum ini diletakkan kertas cakram yang telah dicelupkan terlebih dahulu ke dalam biakan cair mikroba hasil isolasi. Inkubasi pada suhu 25–30°C selama 2–5 hari dan pada akhir masa inkubasi diamati dan diukur hambatan pertumbuhan yang terbentuk^(7,8). Sebagai mikroba indikator digunakan *Bacillus subtilis*, *Enterobacter sp* dan *Aspergillus niger* yang diperoleh dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas, Padang.

HASIL DAN DISKUSI

Dari 30 sampel yang diteliti, diperoleh mikroorganisme yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain di sekelilingnya yang ditandai dengan daerah bening (*inhibition zone*). Mikroorganisme tersebut terdiri dari satu spesies dan golongan jamur (biakan A-b pada medium PDA) dan sembilan spesies dan golongan bakteri (biakan A-4, A-5, B-5, C-6 pada medium NA dan biakan A-6, A-7, B-6, B-8 dan B-10 pada medium PDA). Hasil pengamatan dipaparkan pada **Tabel 1 dan 2**.

Tabel 1. Hasil Pengamatan Hambatan Pertumbuhan Mikroorganisme dari Sampel Tanah dalam Medium Perbenihan Potato Dekstrosa

No.	Kode Biakan	Diameter Hambatan (mm110)	Kriteria Aktifitas
1	A-1	0	Tidak ada aktifitas
2	A-2	0	Tidak ada aktifitas
3	A-3	0	Tidak ada aktifitas
4	A-4	0	Tidak ada aktifitas
5	A-5	0	Tidak ada aktifitas
6	A-6	22	Aktifitas lemah
7	A-7	224	Aktifitas kuat
8	A-8	0	Tidak ada aktifitas
9	A-9	0	Tidak ada aktifitas
10	A-10	105	Aktifitas sedang
11	B-1	0	Tidak ada aktifitas
12	B-2	0	Tidak ada aktifitas
13	B-3	0	Tidak ada aktifitas
14	B-4	0	Tidak ada aktifitas
15	B-5	0	Tidak ada aktifitas
16	B-6	61	Aktifitas lemah
17	B-7	0	Tidak ada aktifitas
18	B-8	55	Aktifitas lemah
19	B-9	0	Tidak ada aktifitas
20	B-10	165	Aktifitas sedang
21	C-1	0	Tidak ada aktifitas
22	C-2	0	Tidak ada aktifitas
23	C-3	0	Tidak ada aktifitas
24	C-4	0	Tidak ada aktifitas
25	C-5	0	Tidak ada aktifitas
26	C-6	0	Tidak ada aktifitas
27	C-7	0	Tidak ada aktifitas
28	C-8	0	Tidak ada aktifitas
29	C-9	0	Tidak ada aktifitas
30	C-10	0	Tidak ada aktifitas

Keterangan:

Aktifitas kuat : diameter hambatan ≥ 200 (mm/10)
Aktifitas sedang : diameter hambatan 100–190 (mm/10)
Aktifitas lemah : diameter hambatan ≤ 100 (mm/10)
Tidak ada aktifitas : diameter hambatan 0 (mm/10)

Tabel 2. Hasil Pengamatan Hambatan Pertumbuhan Mikroorganisme dari Sampel Tanah dalam Medium Perbenihan Nutrien Agar

No.	Kode Biakan	Diameter Hambatan (mm/10)	Kriteria Aktifitas
1	A-1	0	Tidak ada aktifitas
2	A-2	0	Tidak ada aktifitas
3	A-3	0	Tidak ada aktifitas
4	A-4	34	Aktifitas lemah
5	A-5	22	Aktifitas lemah
6	A-6	0	Tidak ada aktifitas
7	A-7	0	Tidak ada aktifitas
8	A-8	0	Tidak ada aktifitas
9	A-9	0	Tidak ada aktifitas
10	A-10	0	Tidak ada aktifitas
11	B-1	0	Tidak ada aktifitas
12	B-2	0	Tidak ada aktifitas
13	B-3	0	Tidak ada aktifitas
14	B-4	0	Tidak ada aktifitas
15	B-5	40	Aktifitas lemah
16	B-6	0	Tidak ada aktifitas
17	B-7	0	Tidak ada aktifitas
18	B-8	0	Tidak ada aktifitas
19	B-9	0	Tidak ada aktifitas
20	B-10	0	Tidak ada aktifitas
21	C-1	0	Tidak ada aktifitas
22	C-2	0	Tidak ada aktifitas
23	C-3	0	Tidak ada aktifitas
24	C-4	0	Tidak ada aktifitas
25	C-5	0	Tidak ada aktifitas
26	C-6	54	Aktifitas lemah
27	C-7	0	Tidak ada aktifitas
28	C-8	0	Tidak ada aktifitas
29	C-9	0	Tidak ada aktifitas
30	C-10	0	Tidak ada aktifitas

Keterangan:

Aktifitas kuat : diameter hambatan ≥ 200 (mm/10)

Aktifitas sedang : diameter hambatan 100–190 (mm/10)

Aktifitas lemah : diameter hambatan ≤ 100 (mm/10)

Tidak ada aktifitas : diameter hambatan 0 (mm/10)

Setelah dilakukan identifikasi berdasarkan data yang diperoleh dan acuan yang sesuai, dapat diketahui bahwa satu spesies dan mikroorganisme hasil isolasi tersebut termasuk kelompok *Penicillium* dan sembilan spesies lainnya termasuk kelompok *Bacillus*, *Streptobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* dan *Coccus* (**Tabel 3 dan 4**). Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa empat spesies termasuk bakteri Gram positif (biakan A-4, A-5, B-6 dan B-8) dan lima spesies termasuk bakteri Gram negatif (biakan A-4, A-10, B-5, B-10 dan C-6). Untuk bakteri Gram negatif ini dilanjutkan dengan beberapa reaksi biokimia yang hasilnya dipaparkan pada **Tabel 5**. Dari data yang diperoleh tersebut, mikroorganisme hasil isolasi belum dapat diidentifikasi nama spesiesnya karena keterbatasan biakan murni dan berbagai mikroorganisme sebagai pembanding.

Hasil uji aktifitas antibiotika terhadap mikroba indikator dipaparkan pada **Tabel 6**. Dan data tersebut terlihat bahwa:

- Satu spesies (biakan B-10) mempunyai aktifitas kuat terhadap *Enterobacter sp.*
- Lima spesies (biakan A-4, A-5, B-6, B-8 dan C-6) mempunyai aktifitas sedang terhadap *Bacillus subtilis*.
- Enam spesies (biakan A-4, A-5, B-5, B-6, B-8 dan C-6)

Tabel 3. Hasil Pengamatan Morfologi Mikroorganisme Penghasil Antibiotika Hasil Isolasi

Kode Biakan	Yang Diamati				
	Bentuk Koloni	Tepian Koloni	Elevasi Koloni	Permukaan Koloni	Warna Koloni
A-4	Bundar	Licin	Cembung	Berkilat	Putih
A-5	Bundar	Licin	Cembung	Berkilat	Putih
A-6	Bundar	Licin	Seperti tetesan	Berkilat	Kusam Orange
A-7	Konsentris	Berombak	Seperti kawah	Berkilat	Kuning muda
A-10	Kompleks	Seperti benang	Berbukit	Tidak rata	Hijau lumut
13-5	Tidak beraturan	Berombak	Seperti tombol	Tidak rata	Putih
13-6	Bundar	Licin	Seperti kawth	Berlekuk	Kemerahan
13-8	Tepian berlekuk . Keriput	Berombak	Cembung	Tidak rata	Putih
B-10	Bundar	Licin	Timbul	Berkilat	Kekuningan
C-6	Bundar	Licin	Cembung	Berkilat	Kuning Krem

Keterangan : Perbesaran 1.000 kali

Tabel 4. Hasil Pengamatan Mikroskopis Mikroorganisme Penghasil Antibiotika Hasil Isolasi dengan Pewarnaan Gram

No.	Kode Biakan	Pengamatan Mikroskopis	Keterangan
1	A-4	Set batang, besar, bentuk brantai	<i>Streptobacillus</i> (Gram -)
2	A-5	Set batang, bulat, melengkung, rapat	<i>Bacillus</i> (Gram -)
3	A-6	Set bulat, tunggal	<i>Coccus</i> (Gram +)
4	A-7	Set bulat, kecil, berkelompok, tunggal, tidak beraturan, rapat	<i>Staphylococcus</i> (Gram +)
5	A-10	Hyfa bersekat, mycelium bercabang, konidia uniseriat	<i>Penicillium</i> (Tidak dilakukan)
6	B-5	Set bulat, besar, jarang, berpasangan, tunggal dan tidak beraturan	<i>Staphylococcus</i> (Gram +)
7	B-6	Set batang, agak membulat, bentuk rantai	<i>Streptobacillus</i> (Gram -)
8	B-8	Set batang, besar, berkapsul terminalis, bentuk rantai	<i>Streptobacillus</i> (Gram -)
9	B-10	Set bulat, kecil, rapat	<i>Coccus</i> (Gram +)
10	C-6	Set bulat, kecil, rapat, bentuk rantai	<i>Streptococcus</i> (Gram +)

mempunyai aktifitas sedang terhadap *Enterobacter sp.*

- Tiga spesies (biakan A-7, B-5 dan B-10) mempunyai aktifitas lemah terhadap *Bacillus subtilis*.
- Dua spesies (biakan A-7 dan A-10) mempunyai aktifitas lemah terhadap *Enterobacter sp.*
- Satu spesies (biakan B-5) mempunyai aktifitas lemah terhadap *Aspergillus niger*.

Penggolongan aktifitas ini dilakukan berdasarkan kriteria yang dilaporkan oleh peneliti terdahulu⁽⁹⁾.

Dari sepuluh mikroorganisme hasil isolasi, hanya satu spesies yang tidak aktif terhadap ketiga jenis mikroba uji yang di-

Tabel 5. Hasil Identifikasi Bakteri dengan Reaksi Kimia

Kode Biakan	TSIA				SC	SS
	A _{butt}	Alk _{slant}	AG	H ₂ S		
A-6	-	+	-	-	+	-
A-7	+	-	-	-	+	+
B-5	+	-	-	-	+	+
B-10	+	-	+	-	+	+
C-6	+	-	+	-	+	+

Keterangan:

TSIA : Triple Sugar Iron Agar

SC : Simmon Sitrat

SS : Semi Solid

A (+) : Terbentuknya asam, ditandai dengan perubahan warna indikator fenol merah menjadi kuning.

Alk (-) : Medium bersifat basa

AG : Adanya gas (gelembung)

H₂S : Adanya warna hitam pada medium TSIA

sc (+) : Terjadi perubahan warna indikator biru bromtimol dari hijau menjadi biru.

SS(+) : Terjadinya pergerakan

Tabel 6. Hasil Pengukuran Diameter Hambatan Pertumbuhan Mikroorganisme Penghasil Antibiotika Hasil Isolasi terhadap Beberapa Mikroorganisme Penguji dengan Metoda Cakram

No.	Kode Biakan	Diameter Hambatan (mm/10)		
		B. subtilis	Enterobacter. sp	A. niger
1	A-4	100	125	0
2	A-5	105	140	0
3	A-6	0	0	0
4	A-7	90	70	0
5	A-10	0	80	0
6	B-5	70	110	80
7	B-6	145	155	0
8	B-8	140	160	0
9	B-10	70	224	0
10	C-6	135	120	0

Keterangan:

Aktifitas kuat : diameter hambatan ≥ 200 (mm/10)

Aktifitas sedang : diameter hambatan 100 – 190 (mm/10)

Aktifitas lemah : diameter hambatan > 60 – 100 (mm/10)

Tidak ada aktifitas : diameter hambatan 0 (mm/10)

Diameter Cakram : 60 (mm/10)

gunakan, yaitu biakan A-6. Hal ini bukan berarti spesies ini tidak menghasilkan antibiotika, karena pada seleksi awal mikroba ini memperlihatkan aktifitas. Ada kemungkinan biakan ini aktif terhadap mikroba lain selain mikroba uji yang digunakan. Dalam percobaan ini mikroba uji yang digunakan sangat terbatas, yaitu masing-masing satu spesies dan golongan jamur, bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif.

Hasil percobaan ini masih merupakan suatu penelitian pendahuluan yang merupakan tahapan dalam upaya mencari se-

nyawa antibiotika baru. Oleh karena itu penelitian ini masih akan dilanjutkan yang meliputi : identifikasi mikroorganisme hasil isolasi sampai diketahui nama spesiesnya, fermentasi dan penentuan kondisi optimum fermentasi untuk produksi antibiotika⁽¹⁰⁾, isolasi dan elusidasi struktur serta penentuan potensi antibiotika yang dihasilkan.

KESIMPULAN

1) Mikroorganisme penghasil antibiotika yang telah diisolasi dan sampel tanah pada penumpukan sampah, di KotoTengah Kotamadya Padang adalah:

- Dari medium *Potato Dextrose Agar*:

Diperoleh satu spesies dan golongan jamur (biakan A-10) dan lima spesies dan golongan bakteri (biakan A-6, A-7, B-6, B-8 dan B-b).

- Dari medium *Nutrient Agar*:

Diperoleh empat spesies dari golongan bakteri (biakan A-4, A-5, B-5 dan C-6).

2) Dari mikroorganisme penghasil antibiotika hasil isolasi, sebanyak sembilan spesies aktif terhadap *Enterobacter sp*, delapan spesies aktif terhadap *Bacillus subtilis* dan satu spesies aktif terhadap *Aspergillus niger*.

KEPUSTAKAAN

1. Akmal, H. Arifin, Hendri. Percobaan pendahuiuan isolasi mikroba tanah penghasil antibiotika dan sampel tanah di kawasan hutan raya Bung Hatta Padang. *Majalah Farmasi Indonesia* 1993; 4(3): 107–12.
2. Dhanuirtto H. *Produksi Antibiotika di Indonesia*. Pros Seminar Nasional Antibiotika, Bandung 1987.
3. Imezawa H. Recent Advances in Bioactive Microbial Secondary Metabolites, *J. Antibiotics* 1987; 30 (Suppl): 38–63.
4. Sasongko SA, Tarigan P. Isolasi dan Skrining Mikroorganisme Tanah ordo Actinomycetes yang Antagonis terhadap Mikrobavitopaten, Pros Seminar Nasional Antibiotika, Bandung 1987.
5. Norris JR, Richmond MH. (Eds.). *Assay in Applied Microbiology*. Chichester, New York, Brisbane, Toronto: John Wiley & Sons, 1981.
6. Rehm Hi, Read G. *Biotechnology Microbiology Fundamental*, Vol. I, Verlag Chemie, Weinheim. 1985.
7. Arret B, Johnson DD, Kirshbaum A. Outline of details for microbiological assays of antibiotics, *J. Pharm. Sci.* 1971; 60; 11: 1689–94.
8. Katz JM, Katz SE. Microbiological assay antibiotics in surface waters, *J. Assoc. of Anal. Chem.* 1983; 66(3): 635–39.
9. Sukandar EY. *Isolasi Antibiotika-Antifungi dan Streptomyces indonesiensis ATCC 35859*, Disertasi Program Doktor, Institut Teknologi Bandung, Bandung 1987.
10. Crueger W, Crueger A. *Biotechnology: A Text Book of Industrial Microbiology*. Translated by C. Haessly and TD. Brock. Science Tech., Inc., Medison. 1984.