

**ISOLASI *ACTINOMYCETES* DARI TANAH
PEMBUANGAN LIMBAH PABRIK GULA TEBU
(CAMMING) BONE SEBAGAI PENGHASIL
ANTIBIOTIKA**

**MUTMAINNAH
N111 09 276**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**ISOLASI *ACTINOMYCETES* DARI TANAH
PEMBUANGAN LIMBAH PABRIK GULA TEBU
(CAMMING) BONE SEBAGAI PENGHASIL
ANTIBIOTIKA**

SKRIPSI

**untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**MUTMAINNAH
N111 09 276**

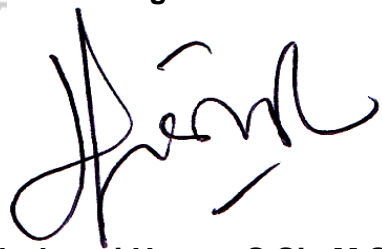
**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

PERSETUJUAN

**ISOLASI *ACTINOMYCETES* DARI TANAH
PEMBUANGAN LIMBAH PABRIK GULA TEBU
(CAMMING) BONE SEBAGAI PENGHASIL
ANTIBIOTIKA**



Prof. Dr.H.M.Natsir Djide, MS. Apt.
NIP. 19500817 197903 1 003


Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19860116 201012 2 009

Pada tanggal : 18 Juli 2013

PENGESAHAN

**ISOLASI ACTINOMYCETES DARI TANAH
PEMBUANGAN LIMBAH PABRIK GULA TEBU
(CAMMING) BONE SEBAGAI PENGHASIL
ANTIBIOTIKA**

Oleh :
MUTMAINNAH
N111 09 276

Dipertahankan Dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada tanggal : 18 Juli 2013

Panitia Penguji Skripsi :

1. Prof. Dr. Hj. Asnah Marzuki, M.Si., Apt. (Ketua) :
2. Dr. Agnes Lidjaja, M.Kes., Apt. (Sekretaris) :
3. Prof. Dr. H. M. Natsir Djide, MS. Apt. (Ex.officio) :
4. Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., Apt. (Ex.officio) : 
5. Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt. (Anggota) :

Mengetahui :
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA, Apt.
NIP. 19560114 198601 2 001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini adalah karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, 18 Juli 2013

Penyusun

MUTMAINNAH

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur dipanjatkan kepada Allah *swt*, atas berkat dan rahmatNya, penulis mampu merampungkan penyusunan skripsi ini sebagai salah satu syarat dalam memperoleh gelar kesarjanaan pada Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Alhamdulillah, terima kasih Ya Allah, Ya Rahmaan, Ya Rahiim, Ya Kariim, Ya Razzaaq, Ya Waduud.

Banyak kendala yang penulis hadapi dalam penyusunan skripsi ini, namun berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, akhirnya penulis dapat melewati kendala-kendala tersebut. Oleh karena itu, penulis menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Bapak Prof. Dr.H.M. Natsir Djide, MS. Apt. sebagai pembimbing utama dan Ibu Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., Apt. sebagai pembimbing pertama yang telah meluangkan waktu dan pikiran serta memberikan arahan, nasihat, dan solusi-solusi dengan penuh kesabaran dan keramahan serta dorongan agar penulis segera menyelesaikan studi, serta Ibu Dra. Aliyah, M.S., Apt. sebagai penasihat akademik atas bimbingan dan arahan dalam pengurusan Kartu Rencana Studi dan penelitian.
2. Dekan, Wakil Dekan, serta staf dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas bantuan serta motivasi-motivasi yang diberikan.

3. Kedua orang tua tercinta, ayahanda H. Sarifuddin dan ibunda Hj. Alfiah, atas segala pengorbanan materi, kasih sayang, ketulusan hati mendoakan sehingga penulis bisa menyelesaikan kuliah sampai saat ini.
4. Saudari dan saudara penulis dr. Paramita s. Ked dan Nurul Haq, atas dukungannya dan kasih sayangnya selama ini. Semoga kita senantiasa menjadi anak yang berbakti, memberikan yang terbaik untuk orang tua kita.
5. Teman-teman farmasi angkatan 2009 (Ginkgo '09), terkhusus Helmi Nurliani, Halijah, Nurul Haq, Satria Putra Penarosa, Nurhadri Azmi, Rizki Husein, Habiburrahim, Harold dan Kuandi untuk beberapa tahun yang sangat menyenangkan.
6. Sahabat-sahabat terdekat penulis yang menemani mulai dari pagi hingga sore terkhusus Helmi Nurliani, Halijah, dan Satria Putra Penarosa, atas segala bantuan, kesenangan, waktu, dan menjadi tempat berkeluh kesah bagi penulis selama ini.
7. Laboran dan kru Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Kak Haslia dan seluruh korps asisten mikrobiologi farmasi terkhusus Kak Sherwin, Nur Afni dan Agnes terima kasih telah memberi bantuan atas segala kesulitan yang dihadapi penulis mulai dari awal hingga akhir penelitian.
8. Kepada pihak yang tidak sempat disebut namanya. Semoga Allah membalas semua kebaikan kalian selama ini.

Penulis menyadari bahwa karya tulis ini sangat jauh dari kesempurnaan, karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun demi terciptanya suatu karya yang lebih bermutu. Akhirnya, semoga karya kecil ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan ke depannya.

Makassar, Mei 2013

Penulis

ABSTRAK

Actinomycetes merupakan salah satu golongan mikroorganisme yang mampu menghasilkan senyawa antimikroba. Telah dilakukan isolasi dan penapisan *Actinomycetes* dari tanah limbah pembuangan limbah pabrik gula tebu (Camming) Bone Makassar. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan *Actinomycetes* penghasil antibiotika berdasarkan identifikasi morfologi dan fisiologi. Isolasi dilakukan dengan metode tuang dan sebar. Dari hasil isolasi diperoleh total 3 isolat. Setelah dilakukan penapisan diperoleh satu isolat aktif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan kode isolat T-3 yang kemudian difermentasi dan diekstraksi untuk memperoleh metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibakteri dengan masing-masing diameter daya hambat untuk konsentrasi 20% b/v, 10% b/v, 5% b/v, 2.5% b/v dan 1.25% b/v ialah berturut-turut 19.23 mm, 16.12 mm, 13.40 mm, 12.79 mm dan 11.79 mm. Hasil identifikasi morfologi dan fisiologi dari isolat T-3 adalah diduga genus *Actinomyces sp* dimana secara morfologi memiliki hifa yang bercabang.

ABSTRACT

Actinomycetes is a group of microorganisms that are able to produce antimicrobial compounds. The isolation and screening of soil *Actinomycetes* of waste soil the waste disposal plant cane sugar (Camming) Bone Makassar, has been conducted. This study aims to obtain antimicrobial-producing *Actinomycetes* based on the identification of morphology and physiology. Isolation was conducted using the pour and spread plate method. The results obtained a total of 3 isolates. The screening of the isolates revealed that one isolate active against *Staphylococcus aureus* with coding is T-3 which is then fermented and extracted to produce secondary metabolites with antibacterial activity with diameters of the inhibition of concentration 20% b/v, 10% b/v, 5% b/v, 2.5% b/v and 1.25% b/v respectively 19:23 mm, 16:12 mm, 13:40 mm, 12:79 mm dan 11:79 mm. Results of morphological and physiological identification of isolates T-3, its *Actinomyces* sp. Where morphologically has branched hypae.

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	iii
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
II.1 Uraian Sampel	5
II.2 Uraian Tentang Actinomycetes	6
II.2.1 Karakteristik Actinomycetes	6
II.2.2 Lingkungan dan Populasi Actinomycetes	6
II.2.3 Klasifikasi Actinomycetes.....	8
II.3 Uraian Tentang Antibiotika.....	8
II.3.1 Penggolongan Antibiotika	10
II.3.2 Mekanisme Kerja	11
II.4 Isolasi Mikroorganisme Tanah	11
II.4.1 Pengambilan Sampel Tanah	11
II.4.2 Identifikasi Mikroorganisme	12

II.5 Pertumbuhan Bakteri	12
II.6 Fermentasi..	15
II.7 Produksi Metabolit Sekunder	16
II.8 Pengujian Aktivitas Antibiotika	18
II.8.1 Metode Pengenceran.....	18
II.8.2 Metode Difusi	18
II.9 Uraian Mikroorganisme Uji yang Digunakan	20
II.9.1 Escherichia coli	20
II.9.2 Staphylococcus aureus.....	20
II.9.3 Candida albicans	21
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN.....	23
III.1 Alat dan Bahan	23
III.2 Metode Kerja.....	24
III.2.1 Sterilisasi Alat	24
III.2.2 Pembuatan Medium.....	24
III.2.2.1 Medium Starch Nitrate Agar	24
III.2.2.2 Medium Starch Nitrate Broth.....	24
III.2.2.3 Medium Produksi	25
III.2.2.4 Medium Potato Dekstrosan Agar	25
III.2.2.5 Medium Nutrient Agar	25
III.2.2.6 Medium Tryptone 1%.....	25
III.2.2.7 Medium Oksidasi Fermentasi 1%	26
III.2.2.8 Fluid Thiolycollate Medium.....	26

III.2.2.9 Medium Starch Agar	26
III.2.2.10 Medium Sukrosa Broth.....	26
III.2.2.11 Medium Glucosa Broth.....	27
III.2.2.12 Medium Lactosa Broth ..	27
III.2.3 Penyiapan Mikroba Uji ..	27
III.2.3.1 Peremajaan Mikroba Uji	27
III.2.4 Pengambilan dan Penyiapan Sampel ..	28
III.2.4.1 Pengambilan Sampel	28
III.2.4.2 Penyiapan Suspensi Sampel ..	28
III.2.5 Isolasi Actinomycetes	28
III.2.6 Penentuan Aktivitas Isolat Actinomycetes	29
III.2.6.1 Penentuan Aktivitas Antibakteri ..	29
III.2.6.2 Penentuan Aktivitas Antifungi ..	29
III.2.7 Fermentasi, Ekstraksi dan Uji Aktivitas Isolat Actinomycetes ...	29
III.2.7.1 Fermentasi	29
III.2.7.2 Ekstraksi Senyawa Metabolit .	30
III.2.7.3 Uji Aktivitas Antibiotika ..	30
III.2.7.4 Pengukuran Zona Hambat ..	31
III.3 Identifikasi Mikroorganisme	31
III.3.1 Identifikasi Morfologi Secara Makroskopik	31
III.3.2 Identifikasi Morfologi Secara Mikroskopik ..	32
III.3.2.1 Pengecatan Gram	32
III.3.2.2 Pewarnaan Spora ..	32

III.3.3 Identifikasi Fisiologi	33
III.3.3.1 Uji Katalase	33
III.3.3.2 Uji Indol	33
III.3.3.3 Uji Karbohidrat ..	33
III.3.3.4 Uji Anaerob ...	33
III.3.3.5 Uji Oksidasi Fermentasi ..	34
III.3.3.6 Uji Polisakarida ..	34
III.4 Pengumpulan dan Analisis Data ..	34
III.5 Kesimpulan ...	34
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
IV.1 Hasil Penelitian.....	35
IV.1.1 Isolasi Bakteri	35
IV.1.2 Hasil Pengujian Antagonis.....	36
IV.1.3 Hasil Pengukuran Diameter Hambatan	37
IV.1.3.1 Hasil Pengukuran Diameter Hambatan Ekstrak Etil Asetat Filtrat.....	37
IV.1.3.2 Hasil Pengukuran Diameter Hambatan Ekstrak Metanol Residu.....	37
IV.1.4 Hasil Identifikasi Mikroorganisme ..	38
IV.2 Pembahasan ...	39
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	45
V.1 Kesimpulan.....	45
V.2 Saran.....	45

DAFTAR PUSTAKA.....	46
LAMPIRAN.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
I. Komposisi Medium.....	50
II. Skema Kerja Secara Umum.....	53
III. Skema Kerja.....	54
a. Isolasi Sampel Tanah.....	54
b. Identifikasi dan Uji Aktivitas Antibiotika.....	54
IV. Gambar Penelitian.....	56

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Pengujian Antagonis Isolat Bakteri Terhadap Pertumbuhan Bakteri.....	36
2. Hasil Pengukuran Diameter Daerah Hambat Ekstrak Etil Asetat Filtrat Terhadap Pertumbuhan Staphylococcus aureus.....	37
3. Hasil Identifikasi Mikroorganisme Isolat T-3.....	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hasil Isolasi Pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-5}	35
2. Hasil Uji Antagonis.....	36
3. Grafik Daya Hambat T-3.....	42
4. Pengenceran Sampel.....	55
5. Hasil Isolasi Pengenceran 10^{-1} , 10^{-4} , 10^{-6} dan 10^{-7}	55
6. Hasil Pertumbuhan Isolat T-1, T-2, T-3 dan Isolat Stok pada Medium SNA.....	56
7. Hasil Identifikasi Morfologi Isolat T-3.....	57
8. Hasil Identifikasi Fisiologi Isolat T-3.....	58
9. Hasil Fermentasi Selama 11 x 24 jam pada Suhu Kamar.....	59
10. Hasil Diameter Hambatan Isolat T-2 pada Medium NA.....	60
11. Hasil Diameter Hambatan Isolat T-3 pada Medium NA.....	61

BAB I

PENDAHULUAN

Antibiotik merupakan suatu zat yang dihasilkan oleh suatu mikroba, terutama fungi yang dapat menghambat atau dapat membasmi mikroba jenis lain (1). Obat-obat antimikroba digunakan untuk membasmi mikroorganisme yang menyebabkan infeksi pada manusia, hewan ataupun tumbuhan harus bersifat toksisitas selektif artinya obat atau zat tersebut harus bersifat sangat toksik terhadap mikroorganisme penyebab penyakit tetapi relatif tidak toksik terhadap jasad inang atau hospes. Mikroorganisme penghasil antibiotik meliputi golongan fungi, bakteri dan virus (2).

Mikroorganisme penghasil antibiotika dapat diisolasi dari tanah, air laut, lumpur, kompos, isi rumen, limbah domestik, bahan makanan busuk dan lain-lain. Tanah merupakan tempat interaksi biologis yang paling dinamis dan mempunyai lima komponen utama yaitu mineral, air, udara, zat organik dan organisme hidup dalam tanah antara lain : bakteri, actinomycetes, fungi, algae, dan protozoa (3).

Peranan terpenting mikroorganisme tanah ialah fungsinya yang membawa perubahan kimiawi pada substansi-substansi di dalam tanah, terutama pengubahan persenyawaan organik yang mengandung karbon, nitrogen, sulfur dan fosfor menjadi persenyawaan anorganik (4).

Sampai saat ini sumber utama antibiotik adalah dari Actinomycetes. Menurut Miyadoh dan Misa (2004) Actinomycetes dikenal sebagai bakteri penghasil antibiotik, karena lebih dari 10.000 antibiotik yang telah ditemukan, dua pertiganya dihasilkan oleh bakteri ini (5).

Actinomycetes termasuk bakteri yang berbentuk batang, gram positif, bersifat anaerobik atau fakultatif. Struktur Actinomycetes berupa filament lembut yang sering disebut hifa atau miselia, sebagaimana yang terdapat pada fungi, memiliki konidia pada hifa yang menegak. Actinomycetes merupakan bakteri yang bereproduksi dengan pembelahan sel, rentan terhadap pinicilin tetapi tahan terhadap zat antifungi. Actinomycetes selalu ditemukan pada substrat alam, seperti tanah dan kompos, air kolam, bahan makanan, dan di atmosfer. Laut dalam, bukan merupakan habitat yang baik bagi Actinomycetes. Actinomycetes hidup dan memperbanyak diri dalam tanah dan kompos pada kedalaman yang bervariasi, pada daerah yang dingin dan tropik. Streptomyces merupakan genus yang paling banyak ditemukan di tanah dan kompos. Pada tanah yang kering dan panas (hangat), banyak ditemukan Actinomycetes, seperti : Streptomyces (6).

Di Indonesia, limbah industri gula (ampas, blotong dan abu ketel) secara umum kurang diperhatikan sebagai sumber bahan organik, dan kalau tidak ditangani secara baik dapat mengganggu lingkungan. Padahal limbah tersebut sebenarnya berpotensi besar sebagai sumber bahan organik dapat mengatasi masalah pengadaan bahan pembenah tanah

dan sekaligus mengurangi pencemaran lingkungan. Limbah proses pabrik gula, antara lain blotong dan ampas tebu yang kadar bahan organiknya dapat mencapai di atas 50% . Limbah padat pabrik gula berpotensi besar sebagai sumber bahan organik yang berguna untuk kesuburan tanah dan merupakan sumber nutrisi untuk pertumbuhan mikroorganisme tanah. Tanah limbah gula tebu merupakan tanah yang basa. Actinomycetes hidup dan memperbanyak diri dalam tanah yang basa dan netral dari pada tanah yang asam seperti humus hutan dan rawa-rawa (7).

Mengingat Indonesia merupakan negara tropis yang iklimnya sangat sesuai untuk pertumbuhan mikroorganisme yang bermanfaat bagi manusia (8) dan pola penyakit di Indonesia menunjukkan bahwa penyakit infeksi masih menempati urutan teratas sehingga kebutuhan akan obat antimikroorganisme cukup besar, sehingga sudah waktunya mulai dikembangkan cara-cara isolasi mikroorganisme tanah (9).

Tanah yang digunakan disini merupakan tanah pada lokasi sekitar pembuangan limbah pabrik gula tebu. Dimana limbah tersebut terdiri dari ampas, blotong dan abu ketel yang mengandung bahan organik sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan berbagai mikroorganisme tanah (7). Rumusan masalah dari penelitian ini yaitu apakah isolat mikroba Actinomycetes dari tanah sekitar pembuangan limbah pabrik gula tebu dapat menghasilkan senyawa antimikroba ?

Berdasarkan hal tersebut maka telah dilakukan penelitian mengenai isolasi mikroba Actinomycetes penghasil antibiotika pada tanah

pembuangan limbah pabrik gula tebu. Adapun maksud dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengisolasi mikroba tanah kelas Actinomycetes sebagai penghasil antibiotika dengan tujuan untuk memperoleh mikroba penghasil antibiotika.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Sampel

Tanah merupakan suatu ekosistem yang mengandung berbagai jenis mikroba dengan morfologi dan sifat fisiologi yang berbeda-beda. Jumlah tiap kelompok mikroba sangat bervariasi, ada yang hanya terdiri atas beberapa individu, ada pula yang jumlahnya mencapai jutaan per g tanah. Banyaknya mikroba berpengaruh terhadap sifat kimia dan fisik tanah serta pertumbuhan tanaman. Dengan mengetahui jumlah dan aktivitas mikroba didalam suatu tanah dapat diketahui apakah tanah tersebut termasuk subur atau tidak karena populasi mikroba yang tinggi menunjukkan adanya suplai makanan atau energi yang cukup, suhu yang sesuai, ketersediaan air yang cukup, dan kondisi ekologi tanah yang mendukung perkembangan mikroba (10). Actinomycetes merupakan kelompok mikroba yang paling banyak menghasilkan senyawa bioaktif antibiotika (70 %), fungi (20 %) dan bakteri (10%) (11).

Tanah limbah gula tebu merupakan tanah limbah proses pabrik gula antara lain blotong dan ampas tebu yang kadar organiknya dapat mencapai di atas 50 %. Limbah pabrik gula berpotensi besar sebagai sumber bahan organik yang berguna untuk kesuburan tanah dan juga sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan mikroba tanah (7).

II.2 Uraian tentang Actinomycetes

II.2.1 Karakteristik Actinomycetes

Actinomycetes adalah organisme tanah yang memiliki sifat-sifat yang umum dimiliki oleh bakteri dan jamur tetapi juga mempunyai ciri khas yang cukup berbeda. Pada lempeng agar, Actinomycetes dapat dibedakan dengan mudah dengan bakteri yang sebenarnya. Tidak seperti koloni bakteri sebenarnya yang jelas berlendir dan tumbuh dengan cepat, sedangkan koloni Actinomycetes muncul perlahan menunjukkan konsistensi berbutir dan melekat erat pada permukaan agar. Pengamatan yang diteliti pada suatu koloni dibawah mikroskop yang membentuk spora aseksual untuk perkembangbiakannya (12).

Actinomycetes awalnya dinamakan "ray fungi". Actinomycetes tumbuh dalam bentuk filamen miselium dan membentuk spora. Ada dua hal penting untuk membedakan antara fungi dengan Actinomycetes, yakni : 1). Actinomycetes tidak mempunyai nukleus, sehingga dimasukkan prokariotik; 2). Bentuk hifa Actinomycetes dengan diameter 0,5 – 10 mm, sehingga lebih kecil dari hifa jamur (3 – 8 mm diameternya) (13).

II.2.2 Lingkungan dan Populasi Actinomycetes

Actinomycetes termasuk bakteri yang tidak tahan asam, berbentuk batang, gram positif, bersifat anaerobik atau anaerobik fakultatif (mampu tumbuh baik jika ada terdapat O₂ bebas atau tidak ada O₂). Actinomycetes tidak toleran terhadap asam dan jumlahnya menurun pada keadaan lingkungan dengan pH dibawah suhu 5,0. Rentang pH yang paling cocok

untuk perkembangbiakkan Actinomycetes adalah antara 6,5 – 8,0. Tanah yang tergenang air tidak cocok untuk pertumbuhan Actinomycetes, sedangkan tanah gurun yang kering atau setengah kering dapat mempertahankan populasi dalam jumlah besar, karena adanya spora. Pertumbuhan optimum pada suhu antara 28 – 37°C, tetapi beberapa Actinomycetes masih dapat tumbuh dalam jumlah besar pada suhu 55 - 65°C (14).

Populasi Actinomycetes berada pada urutan kedua setelah bakteri, bahkan kadang-kadang hampir sama Actinomycetes hidup saprofit dan aktif mendekomposisi bahan organik, sehingga dapat meningkatkan kesuburan tanah. Actinomycetes merupakan salah satu mikroorganisme yang mampu mendegradasi selulosa disamping bakteri, kapang dan khamir. Jenis Actinomycetes tergantung pada tipe tanah, karakteristik fisik, kadar bahan organik, dan pH lingkungan (14).

Actinomycetes terdiri dari 10 – 20 % total populasi mikroba dalam tanah. Jumlah Actinomycetes meningkat dengan adanya bahan organik yang mengalami dekomposisi. Organisme ini ditemukan (hampir semua), dalam kompos dan sedimen (14).

II.2.3 Klasifikasi Actinomycetes

Actinomycetes termasuk ordo Actinomycetales. Dimana terdiri atas 3 famili yaitu (15):

a. Famili Mycobacteriaceae

Sel- sel tidak membentuk miselium atau hanya miselium yang rudimenter. Misalnya Mycobacterium dan Mycococcus.

b. Familia Actinomycetaceae

Tidak membentuk spora dan motil. Misalnya Actinomyces dan Nocardia.

c. Familia Streptomycetaceae

Membentuk miselium, miselium vegetatif tidak terbagi-bagi. Misalnya Streptomyces, Micromonosora dan Thermoactinomyces.

II.3 Uraian tentang Antibiotika

Aktivitas antibiotika untuk pertama kalinya ditemukan secara kebetulan oleh Sir Alexander Fleming (inggris, 1829, Penicillin) yang merupakan titik tolak penelitian yang menghasilkan senyawa dengan daya anti infeksi yang sangat menakjubkan, yang sekarang dikenal dengan nama antibiotika. Akan tetapi penemuan Fleming tersebut tidak mempunyai arti dalam pengobatan praktis, sebelum Florey dan Chain serta kawan-kawannya di Oxford melakukan penelitian penerapan antibiotika tersebut dalam terapi. Namun jauh sebelumnya manusia telah menggunakan sejumlah bahan yang pada saat ini diduga efektif karena mengandung bahan yang bersifat antibiotika (1).

Penemuan Vuillemin pada tahun 1889 telah menggunakan istilah antibiosis (melawan hidup) yang diartikan bahwa suatu organisme yang menghancurkan yang lain dalam melindungi kepentingan hidupnya sendiri. Dari kata dasar inilah berkembang menjadi kata antibiotika yang luas digunakan baik oleh masyarakat awam, profesi kesehatan ataupun oleh ilmu pengetahuan lainnya, sehingga istilah tersebut hampir tidak mungkin untuk didefinisikan secara memuaskan. Demikian pula Waksman pada tahun 1943 mengatakan definisi yang lebih luas digunakan, bahwa antibiotika atau bahan antibiotika adalah bahan yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang mempunyai kemampuan menghambat atau mematikan mikroorganisme lain. Disamping itu Benedict dan Langlyke mengatakan bahwa antibiotika adalah senyawa kimia yang diturunkan dari atau diproduksi oleh organisme hidup yang dalam kadar kecil mampu menghambat proses kehidupan mikroorganisme lain (2).

Antibiotika merupakan substansi yang dihasilkan oleh mikroorganisme, dalam konsentrasi rendah mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme lain. Setiap antibiotik mempunyai aktivitas penghambatan hanya terhadap grup kuman spesifik, yang disebut spektrum penghambat. Sampai saat ini telah ditemukan lebih dari 3000 antibiotik, namun hanya sedikit saja yang diproduksi secara komersil. Beberapa antibiotik telah dapat diproduksi dengan kombinasi sintesis mikroorganisme dan modifikasi kimia, antara lain golongan penisilin, sefalosporin, dihidrostreptomisin, klindamisin, tetrasiklin dan

rifampisin. Pengujian potensi antibiotik adalah suatu teknik pengujian potensi suatu antibiotik dengan cara mengukur efek senyawa-senyawa tersebut terhadap pertumbuhan mikroba uji (16).

II.3.1 Penggolongan Antibiotika

Antibiotika dapat digolongkan berdasarkan atas tempat kerja, spektrum aktivitas dan struktur kimia. Sedangkan penggolongan antibiotika berdasarkan atas spektrum aktivitasnya dapat dibagi atas beberapa golongan yaitu (2):

1. Antibiotika dengan spektrum luas, efektif baik terhadap gram positif maupun gram negatif. Sebagai contohnya adalah turunan tetrasiklin, turunan amfenikol, turunan aminoglikosida, turunan makrolida, rifampisin, beberapa turunan penisilin (ampisilin, amoksisilin, bakampisin, karbenisilin, hetasilin dan lain-lain dan sebagian besar turunan sefalosporin).
2. Antibiotika yang aktivitasnya lebih dominan terhadap bakteri gram positif. Sebagai contohnya adalah basitrasin, eritromisin, sebagian besar turunan penisilin seperti benzil penisilin, kloksasilin, penisilin G prokain dan beberapa turunan sefalosporin.
3. Antibiotika yang aktivitasnya lebih dominan terhadap bakteri gram negatif. Sebagai contohnya adalah kolistin, polimiksin B sulfat, dan sulfomisin.

4. Antibiotika yang aktivitasnya dominan pada Mycobacteriae. Sebagai contohnya adalah streptomisin, kanamisin, sikloserin, vimisin dan lain-lain.
5. Antibiotika yang aktif terhadap jamur. Sebagai contohnya adalah grisofulvin, antibiotika polien (nistatin dan amfoterisin B).
6. Antibiotika yang aktif terhadap neoplasma (anti kanker). Sebagai contohnya adalah aktinomisin, bleomisin, mitomisin, mitramisin dan lain-lain.

II.3.2 Mekanisme Kerja

Berdasarkan mekanisme kerjanya antibiotika dikelompokkan kedalam (17):

1. Antibiotika yang mengganggu serta merusak metabolisme sel mikroba.
2. Antibiotika yang menghambat sintesis dinding sel mikroba.
3. Antibiotika yang mengganggu keutuhan membran sel mikroba.
4. Antibiotika yang menghambat sintesis protein sel mikroba.
5. Antibiotika yang menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba.

II.4 Isolasi Mikroorganisme Tanah

II.4.1 Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah dikumpulkan pada kedalaman 5 cm - 15 cm dari permukaan tanah dan dipindahkan ke tempat yang bersih. Diambil dari beberapa titik yang kemudian dicampur rata. Dari campuran sampel

tersebut diambil beberapa gram tanah yang digunakan sebagai sampel pengujian (12).

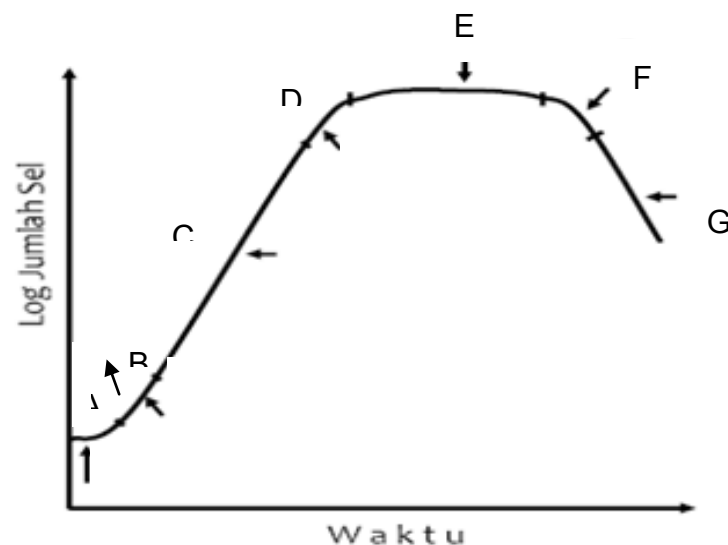
II.4.2 Identifikasi Mikroorganisme

Langkah pertama yang dilakukan untuk identifikasi mikroorganisme adalah identifikasi morfologi makroskopik, identifikasi morfologi mikroskopik dan identifikasi fisiologi.

- Identifikasi morfologi secara makroskopik meliputi sifat-sifat koloni (bentuk,warna,keadaan permukaan dan tepi koloni).
- Identifikasi morfologi secara mikroskopik meliputi pengecatan gram dan pengecatan spora.
- Identifikasi fisiologi meliputi uji katalase,uji indol,uji katalase,uji polisakarida dan uji glukosa, laktosa serta sukrosa (16).

II.5 Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai pertambahan jumlah atau volume serta ukuran sel. Pertumbuhan sel bakteri biasanya mengikuti suatu pola pertumbuhan tertentu berupa kurva pertumbuhan sigmoid.



Fase-fase pertumbuhan, yaitu:

- A : Fase permulaan (adaptasi)

Pada fase ini mikroorganisme melakukan penyesuaian diri dengan lingkungannya yang baru. Berbagai macam enzim dan zat-zat perantara yang dibentuk pada fase ini, sehingga memungkinkan akan terjadi pertumbuhan lebih lanjut. Sel-sel pada fase ini mulai membesar, tetapi belum melakukan pembelahan sel.

- B : Fase pertumbuhan dipercepat

Bersama-sama dengan fase permulaan fase ini disebut fase penyesuaian diri "lag phase" atau "phase of adjustment" terhadap faktor lingkungan yang ada. Populasi sel yang ada mulai menyesuaikan diri terhadap jenis nutrisi yang baru, enzim induktif dibentuk oleh sel selama fase penyesuaian diri ini. Kecepatan pertumbuhan makin lama makin tinggi waktu generasi (waktu yang dibutuhkan oleh populasi sel untuk berkembang menjadi dua kali lipat).

- C : Fase pertumbuhan logaritma

Pada saat ini anggota populasi sel berkembang biak dengan kecepatan maksimum yang konstan. Waktu generasi paling pendek dan konstan pada setiap titik digaris fase ini. Ukuran sel paling minimum dengan dinding sel dan membran sitoplasma paling tipis. Kecepatan metabolismenya paling tinggi. Bila populasi sel dari fase ini dipindahkan ke medium baru dengan komposisi dan kondisi

lingkungan yang sama, maka dalam medium baru ini populasi sel akan langsung mengalami fase pertumbuhan logaritma, tanpa melalui fase adaptasi. Berakhirnya fase logaritma ini disebabkan oleh habisnya nutrisi (sebagian atau seluruh komponen).

- D : Fase pertumbuhan mulai terhambat

Pada fase ini kecepatan pertumbuhan menurun. Jumlah sel mati semakin bertambah, disebabkan oleh peracunan metabolit. Pada fase ini pertumbuhan sel tidak stabil, tetapi jumlah populasi naik karena jumlah sel yang tumbuh masih banyak dibanding dengan jumlah sel yang mati.

- E : Fase stasioner maksimum

Pada saat ini jumlah sel yang hidup seimbang dengan jumlah sel yang mati yang disebabkan oleh peracunan metabolit. Ukuran sel pada fase ini menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun nutrisi sudah mulai habis. Karena kekurangan zat nutrisi, maka sel kemungkinan mempunyai komposisi berbeda dengan sel yang tumbuh pada fase logaritmik. Pada fase ini sel-sel menjadi lebih tahan terhadap keadaan ekstrim seperti panas, dingin, radiasi dan bahan kimia.

- F : Fase kematian dipercepat

Pada fase ini jumlah sel yang mengalami kematian makin lama makin banyak, sedangkan jumlah pembentukan sel baru makin lama makin menurun.

- G : Fase kematian logaritma

Pada fase kematian ini tidak terjadi perkembangbiakan sel, yang terjadi adalah kematian sel dengan kecepatan konstan (2).

II.6 Fermentasi

Fermentasi dalam mikrobiologi industri digambarkan sebagai proses untuk mengubah bahan dasar menjadi produk yang dikehendaki dalam kultur mikroba tertentu.

Sistem fermentasi dapat dilakukan dengan 3 macam, yaitu :

1. Sistem *Batch*

Sistem ini adalah sistem yang paling sederhana dan sering digunakan di laboratorium untuk mendapatkan produk sel atau metabolitnya. Fermentasi sistem *batch* adalah sistem tertutup, artinya semua nutrisi yang dibutuhkan mikroba selama pertumbuhan dan pembentukan produk berada di dalam 1 fermentor. Jadi tidak ada penambahan bahan atau pengambilan hasil selama fermentasi berlangsung.

2. Sistem *Fed-batch*

Sistem ini tidak tertutup seperti halnya sistem *batch*. Selama fermentasi, substrat, nutrisi, atau inducer dapat ditambahkan ke dalam

fermentor. Sistem *fed-batch* dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu sistem volume tetap dan sistem volume berubah. Sistem volume tetap berarti setiap ada penambahan medium baru ke dalam fermentor, ada medium lama, produk, atau sel yang dikeluarkan sebanyak medium baru yang dimasukkan fermentor; sedangkan sistem volume berubah, berarti ke dalam fermentor ditambahkan medium baru tetapi tidak ada medium lama atau produk yang dikeluarkan dari dalam fermentor.

3. Sistem *Continuous*

Sistem fermentasi ini biasanya digunakan dalam skala industri. Sistem *continuous* adalah sistem *batch* yang fase eksponensialnya diperpanjang, dengan tetap menjaga fluktuasi nutrisi dan jumlah sel/biomassa. Mikroba diberi nutrisi/medium segar, sementara itu sejumlah sel atau medium dikeluarkan dari sistem dengan kecepatan yang sama. Hal ini menjamin tingkat kestabilan dari faktor-faktor seperti volume kultur, biomassa, konsentrasi produk dan substrat, pH, suhu, dan oksigen terlarut (25).

II.7 Produksi Metabolit Sekunder

Ada beberapa metode yang dapat digunakan dalam proses fermentasi mikroorganisme antara lain (26):

1. Kultur Permukaan (*surface culture*)

Pada metode ini, medium diinokulasikan spora atau miselium fungi. Miselium akan tumbuh diseluruh permukaan medium cair membentuk suatu koloni bervariasi. Ini merupakan metode yang paling

mudah dan murah, akan tetapi memiliki beberapa kerugian yaitu pertumbuhan yang tidak homogen dimana koloni terdiri dari beberapa miselium yang berbeda pertumbuhannya dan lingkungan tumbuhnya dimana miselium yang berada diatas permukaan koloni berada dalam kondisi yang lebih aerobik dibandingkan yang dibawah permukaan koloni, hal ini berkebalikan pada keadaan kontak dengan medium.

2. Kultur dengan pengocokan (*shaker culture*)

Pada metode ini medium dikocok setelah diinokulasikan spora atau miselium sehingga pertumbuhan akan tampak pada seluruh medium. Kelebihan metode ini dibandingkan dengan metode kultur permukaan yaitu pemanfaatan medium oleh mikroorganisme lebih efisien, mempercepat pertumbuhan dan pertumbuhannya lebih homogen.

3. Kultur dengan pengocokan, mengalirkan udara (*stirred aerate culture*)

Metode ini merupakan pengembangan dari metode kultur dengan pengocokan, menggunakan pengaduk medium dan jalur udara atau oksigen. Dikarenakan efisiensi pengocokan dan aerasi produksi dapat meningkat pesat dan ini merupakan metode yang paling efisien untuk memproduksi metabolit fungi dalam skala besar.

4. Kultur berkelanjutan (*continous culture*)

Metode ini dilakukan dengan cara berkala mengganti medium pada fermentor dengan medium fermentasi yang baru, hal ini akan menyebabkan proses fermentasi akan terus berlangsung. Metode ini

akan sangat bermanfaat untuk penelitian laboratorium fermentasi, karena dengan menjaga ketersediaan medium baru kita dapat menjaga proses fermentasi pada tahapan yang diinginkan sementara efek yang lain dipelajari.

II.8 Pengujian Aktivitas Antibiotik

II.8.1 Metode Pengenceran

Metode ini menggunakan teknik tabung pengenceran penghambatan pertumbuhan (berkurangnya pertumbuhan) yang dihasilkan oleh sampel yang diuji terhadap pertumbuhan mikroorganisme dapat diukur dengan alat Fotokolorimeter. Prinsip kerjanya yaitu cahaya yang mengenai sel-sel mikroorganisme di dalam sampel akan dihamburkan sedangkan cahaya yang diteruskan setelah melewati suspensi mikroorganisme akan mengaktifasi foto tabung yang akan mencatat persen transmittan (%T). Makin sedikit jenis sel di dalam suspensi maka makin besar intensitas cahaya yang lolos dan semakin tinggi pula persen transmittan yang tercatat (18).

II.8.2 Metode Difusi

Metode difusi adalah proses perembesan larutan contoh media. Pada media ini kemampuan zat antibiotika ditentukan berdasarkan daerah hambatan yang dibentuk oleh larutan contoh terhadap pertumbuhan mikroorganisme uji pada media tersebut. Beberapa modifikasi dari cara ini adalah (18):

1. Metode Difusi dengan Plat Silinder

Cara ini berdasarkan perbandingan antara daerah hambatan yang dibentuk oleh larutan contoh terhadap pertumbuhan mikroorganisme dengan daerah hambatan yang terjadi oleh larutan pembanding. Pada cara ini digunakan plate silinder yang diletakkan pada media kemudian larutan contoh dimasukkan ke dalam plate silinder tersebut.

2. Metode Difusi dengan Cup Plate

Prinsip cara ini sama dengan plat silinder perbedaannya disini digunakan mangkok yang dibuat langsung pada media agarnya.

3. Metode Difusi dengan Kertas Saring

Perbedaan metode ini dengan cara-cara di atas yaitu metode ini digunakan kertas saring yang dibuat dengan bentuk dan ukuran tertentu biasanya berbentuk bulat dengan diameter 0,7-1,0 cm yang nanti akan dicelupkan dalam larutan contoh dan larutan pembanding. Pengamatan dilakukan setelah masa inkubasi dengan mengukur daerah hambatan yang terjadi.

4. Metode Difusi Kirby Bauer

Prinsip dan cara kerjanya sama dengan metode difusi kertas saring. Perbedaannya adalah di sini menggunakan alat untuk meletakkan kertas saring ke dalam cawan petri yang berukuran 15 x 50 mm sehingga langsung di uji dengan berbagai variasi konsentrasi dalam larutan contoh.

5. Metode Agar Berlapis

Cara ini merupakan dari cara Kirby Bauer. Perbedaannya adalah pada cara ini menggunakan dua lapis agar, lapisan pertama “Base Layer” tidak mengandung bakteri yang dicampurkan pada media agar.

II.9 Uraian Mikroorganisme Uji yang Digunakan

II.9.1 *Escherichia coli*

Divisi : Protophyta

Kelas : Schizomycetes

Bangsa : Eubacteriales

Famili : Enterobacteriaceae

Genus : *Escherichia*

Species : *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif, berbentuk batang yang pendek dengan diameter 0,4 – 0,7 μm x 1,4 μm , mempunyai flagella peritrik yang digunakan sebagai alat untuk bergerak dan ada juga yang tidak bergerak. Bakteri ini bersifat anaerobik fakultatif dapat memfermentasi laktosa dan menghasilkan gas.

Bakteri ini biasa ditemukan dalam saluran pencernaan manusia maupun hewan vertebrata. Di alam bebas biasa terdapat dalam air, tanah, dan bahan organik. Suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah suhu 37°C (14).

II.9.2 *Staphylococcus aureus*

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteriales
Famili	: Micrococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Species	: <i>Staphylococcus aureus</i>

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif, berbentuk bulat dengan diameter 0,8 – 1,0 μm , tidak mempunyai alat gerak dan tidak tahan asam. Bakteri *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh pada suhu 10 - 45°C dengan suhu optimum yaitu 37°C. Pada tubuh biasanya terdapat pada permukaan kulit, saluran pernapasan bagian atas, saluran air kemih, mulut, hidung, luka yang terinfeksi, selaput lendir dan tempat-tempat lainnya (14).

II.9.3 *Candida albicans*

Divisi	: Eumycophyta
Kelas	: Ascomucetes
Bangsa	: Saccharomycetales
Famili	: Cryptococcaceae
Genus	: Candida
Species	: <i>Candida albicans</i>

Spesies *Candida* dianggap Yeast karena tumbuh pada budaya tipikal pada ukuran 4 – 6 μm , berbentuk lingkaran atau oval dibawah

kondisi dan suhu terbaik. Perhatian besar lebih banyak ditujukan kepada *Candida albicans* karena sering menyebabkan penyakit dibanding dengan spesies lainnya. Penyakit yang disebabkan oleh *Candida* adalah Kandidiasis. Kandidiasis ini yang paling sering dijumpai pada infeksi akut dan kronik dari kulit, kuku dan membran mukosa (14).