

Isolasi Bakteri Dari Tanah Rhizosfer Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora* L.) Sebagai Penghasil Antibakteri

Isolation Bacteria From The Soil Rhizosphere Robusta Coffee Plant (*Coffea canephora* L.) Producer Antibacteria

Samsul Hardi¹, Agus sangka pratama², Rusman³
^{1,2,3}Fakultas MIPA Universitas Islam Makassar

Corresponding Author
Samsulhardi.sh@gmail.com

ABSTRAK

Tanah Rhizosfer merupakan tanah sekitar tanaman yang memiliki kandungan yang seperti pada tanaman tempatnya tumbuh. Banyak kandungan tanah Rhizosfer dapat digunakan sebagai antibakteri. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengisolasi bakteri dari tanah Rhizosfer tanaman kopi robusta (*Coffea canephora* L.) sebagai antibakteri. Metode penelitian ini dimulai isolasi bakteri Rhizosfer, pemurnian, uji skrining aktivitas antibakteri, fermentasi uji aktivitas antibakteri dan kromatografi lapis tipis. Hasil yang diperoleh yaitu pada proses isolasi didapatkan 4 isolat. Isolat 4 memiliki aktivitas menghambat bakteri *Escherhicia coli* yang terbesar sehingga digunakan tahap selanjutnya dengan konsentrasi 2,5%; 5%; 10% yang memiliki diameter hambat sebesar 6,23mm, 6,29mm dan 6,40mm. Hasil untuk identifikasi kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat tidak menunjukkan bercak (tidak ada senyawa). Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa konsentrasi 10% memiliki diameter hambat terbesar terhadap bakteri *Escherhicia coli* yaitu 6,40mm namun tidak dapat teridentifikasi pada metode KLT.

KATA KUNCI

Rhizosfer, Antibakteri, Kopi robustas (Coffea canephora L)

ABSTRACT

Rhizosphere soil is the soil around plants that has the same content as the plant where it grows. Much of the Rhizosphere soil content can be used as an antibacterial. The purpose of this study was to isolate bacteria from the rhizosphere soil of robusta coffee plants (*Coffea canephora* L.) as antibacterial. This research method begins with the isolation of rhizosphere bacteria, purification, antibacterial activity screening test, fermentation antibacterial activity test and thin layer chromatography. The results obtained were in the isolation process, 4 isolates were obtained. Isolate 4 had the greatest activity against *Escherhicia coli* bacteria, so the next step was used with a concentration of 2.5%; 5%; 10% which have inhibition diameters of 6.23mm, 6.29mm and 6.40mm. The results for the identification of thin layer chromatography of the ethyl acetate extract showed no spots (no compound). Based on these data, it can be concluded that a concentration of 10% has the largest inhibitory diameter against *Escherhicia coli* bacteria, which is 6.40mm but cannot be identified by the TLC method.

KEYWORD

Rhizosphere; Antibacterial; Robusta coffea (Coffea canephora L.);

PENDAHULUAN

Mikroorganisme banyak menyebabkan Infeksi penyakit yang dapat ditularkan, dari inang satu ke inang lainnya. Banyak penyakit infeksi yang dapat ditularkan yang dapat saja tidak memberikan simptom atau gejala dan tubuh tidak mampu menghilangkan keberadaan mikroorganisme setelah periode penyembuhan penyakit. Saat bakteri sudah melalui tahap melepaskan racun maka tubuh membutuhkan senyawa untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme tersebut yang dikenal sebagai antibiotik (Letter and Rochelle, 1998).

Antibiotik merupakan senyawa yang digunakan pada infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme salah satunya adalah bakteri. Namun saat ini antibiotik tidak efektif dalam memberikan efek terapi bahkan dapat meningkatkan resiko keparahan penyakit dan kematian ((Radji, 2005; Utami, 2012). Resistensi antibiotik menjadi salah satu dari 10 masalah kesehatan di dunia. Sehingga diperlukan peranan senyawa antibiotik lainnya untuk mengatasi resistensi tersebut. Antibiotik dapat diperoleh dari metabolit sekunder yang berasal dari alam salah satunya tanah((Rusman, yasnidar, 2020).

Pemanfaatan bahan alam yang berfungsi sebagai antibiotik salah satunya adalah kopi robusta (*Coffea canephora* L.). Selain itu, tanah yang beradiah disekitar perakaran kopi robusta terdapat bakteri yang hidup berdampingan yang disebut dengan bakteri Rhizosfer. Aktivitas mikroorganisme Rhizosfer dipengaruhi oleh eksudat yang dihasilkan oleh perakaran tanaman. Beberapa mikroorganisme Rhizosfer berperan dalam siklus hara dan proses pembentukan tanah, pertumbuhan tanaman, mempengaruhi aktivitas mikroorganisme, serta sebagai pengendali hayati terhadap patogen akar (Hasanuddin, Jasmiadi and Abdillah, 2021)

Bakteri dapat bersifat menguntungkan, salah satunya digunakan sebagai antibiotik. Namun, penelitian terhadap antibiotik baru masih perlu dilakukan menimbang banyaknya kasus resistensi antibiotik di masyarakat(Kemenkes RI, 2011). Rhizosfer merupakan bagian zona tanah yang mengelilingi akar dari suatu tanaman, dimana sifat biologi dan sifat kimia tanah dipengaruhi oleh akar. Penelitian yang dilakukan umi fatmawati (2014) menunjukkan beberapa mikroba di daerah Rhizosfer seperti *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Actinomycetes* sp., dan *Enterobcter* sp., dapat memberikan efek antibakteri.

Berdasarkan uraian diatas maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah isolat bakteri dalam tanah Rhizosfer tanaman kopi robusta (*Coffea canephora* L.) menghasilkan senyawa bersifat sebagai antibakteri. Tujuan dari penelitian ini untuk mengisolasi adanya bakteri dari tanah Rhizosfer tanaman kopi robusta (*Coffea canephora* L.) sebagai penghasil antibakteri.

METODE PELAKSANAAN

Penelitian dilakukan pada bulan Maret-Juni 2021 di Laboratorium farmakognosifitokimia dan Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Islam Makassar.

Alat & bahan

Alat yang digunakan adalah Autoklaf, Cawan Petri, Detektor Sinar UV 245 Nm Dan 366 Nm, Enkas, Gelas Kimia, Gelas Ukur, Inkubator, Jarum Ose, Lampu Spirtus, Oven, Pipet Tetes, Pipet Skala, Rak Tabung, Pipet Mikro, , Rak Tabung Reaksi, Spoit, Timbangan Analitik

Bahan yang digunakan adalah Aqudest ,Aqua Pro Injeksi, Bakteri *Escherichia Coli*, Bakteri *Staphylococcus Aureus*, Etanol 70%, Etil Asetat, Medium NA (*Nutrient Agar*), Kertas Cakram, Metanol, NB (*Nutrient Borth*), N-Heksan, Nacl Fisiologis (Nacl 0,9%), Tanah Rhizhosfer Akar Kopi Robusta.

Preparasi sampel

Sampel yang digunakan adalah Tanah Rhizosfer yang di ambil dari Desa Jolle, Kecamatan Lalabata, Kabupaten Soppeng Provinsi sulawesi Selatan. Lintang Selatan 4°26'50.6256" Bujur Timur 119°48'43.4844". Sampel Rhizosfer tanaman kopi robusta diambil dengan cara tanah tersebut digali dengan kedalam 15 cm dari permukaan tanah. Setelah irtu sampel diambil dengan menggunakan sendok *stainlees steel* yang telah disprotkan dengan etanol 70%. Sampel dimasukkan kedalam wadah yang telah disterilkan, kemudian sampel dibawa ke laboratorium.

Sterilisasi alat

Seluruh alat yang akan digunakan dicuci dengan deterjen dibilas dengan air sampai bersih, dikeringkan dan terlebih dahulu. Alat seperti gelas ukur, labu ukur, dan tip mikropipet dimasukkan kedalam plastik tahan panas disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit suhu 121°C selama 15 menit. Bahan-bahan terbuat dari karet disterilkan dan direndam dengan alkohol 70% dan jarum ose disterilkan dan dipijarkan menggunakan lampu spiritus. Alat-alat kaca seperti tabung reaksi, beaker glass dan erlemeyer ditutup mulutnya dengan kapas cawang petri dibungkus dengan kertas dan disterilkan dengan oven pada suhu 180 °C selama 2 jam.

Isolasi bakteri rhizosfer tanah kopi robusta

Tanah yang telah diambil selanjutnya diisolasi dengan pengenceran. Rhizosfer sebanyak 1 gram dimasukkan kedalam botol pengencer dan dicukupkan dengan Aqua Pro Injeksi hingga 10 mL. Kemudian dibuat pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} .

Suspensi sampel dari setiap pengenceran diambil 1 ml secara aseptis, kemudian

dimasukkan ke dalam cawan petri, lalu ditambahkan medium Nutrien agar (NA) sebanyak 2g dan dihomogenkan. kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

Pemurnian isolate bakteri

Isolat bakteri yang didapat dari proses sebelumnya ditumbuhkan pada media NA yang baru dengan menggunakan metode gores kuadran. Bakteri yang tumbuh terpisah pada empat kuadran tersebut diremajakan pada media NA selama 1x 24 jam sebagai isolat murni untuk digunakan pada penelitian selanjutnya.

Penyiapan bakteri uji *Escherhicia coli* dan *Staphylococcua aureus*

Peremajaan bakteri uji dilakukan dengan mengambil 1 ose biakan bakteri murni kemudian digoreskan di atas permukaan media kemudian diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Bakteri uji hasil peremajaan diambil dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 mL larutan NaCl steril 0,9%. Kekeruhan yang diperoleh kemudian disetarakan dengan standar Mcfarland.

Uji skrining aktivitas antibakteri

Uji skrining aktivitas antibakteri isolat Bakteri Rhizosfer diletakkan pada permukaan medium *Nutrient Agar* (NA) yang berisi bakteri uji. Diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37,5°C, lalu diamati kemampuannya dalam menghambat mikroba uji yang ditandai dengan terbentuknya zona bening, hitung diameter zona bening tersebut.

Fermentasi isolate bakteri aktif

Fermentasi dilakukan selama 7 hari pada kondisi tershaker dengan kecepatan 200 rpm. Selanjutnya media hasil fermentasi disaring untuk memisahkan supernatan. Untuk penyiapan ekstrak senyawa metabolit isolat, sebagian fermentat dipartisi cair cair dengan menggunakan pelarut Etil asetat dan air. Ekstrak larut etil asetat yang diperoleh kemudian diuapkan kemudian disimpan dalam desikator untuk digunakan pada pengujian selanjutnya.

Pengujian aktifitas hasil fermentasi

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan cara difusi agar menggunakan *paper disc*. pada medium Nutrien Agar disuspensi dengan mikroba uji yang sudah diukur serapannya, diinokulasi 20 µl suspensi mikroba uji kedalam cawan petri tersebut, lalu dituang 10 ml medium NA, lalu diletakkan dalam cawan petri yang telah berisih medium dan mikroba uji, selanjutnya diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C kemudian diamati zona hambat yang terbentuk dengan diameter *paper disc* 6 mm.

Identifikasi senyawa isolate dengan kromatografi lapis tipis

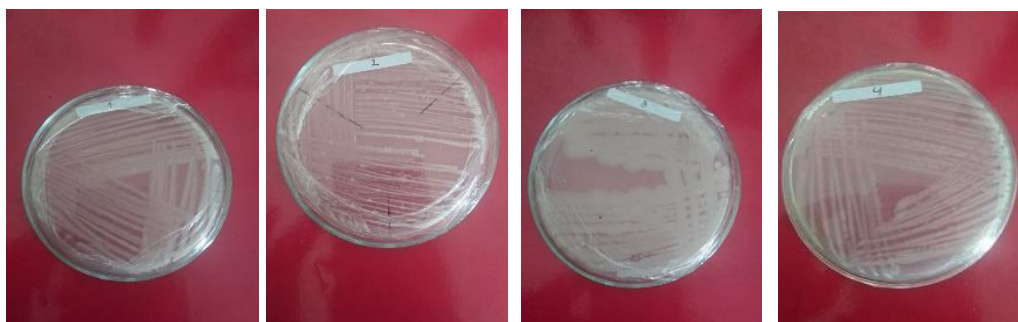
Pengujian KLT dilakukan yaitu masing-masing ekstrak dilarutkan dengan etil asetat lalu ditotolkan pada lempeng KLT ukuran 7x1,5 cm menggunakan pipet kapiler kemudian dimasukkan dalam benjana kromatografi yang dijenuhkan dengan cairan Etil asetat Metanol (2:1), Heksan : Etil Asetat : Metanol (1:7:2), Hekan : Etil Asetat : Metanol (2:6:1), dan Heksan : Etil Asetat : Metanol (6:4:1). Kemudian dibiarkan terelusi, lalu dikeluarkan dari benjana, diamati dibawah sinar UV 254 nm dan UV 366 nm diperhatikan flouresensi dan dihitung nilai Rf nya.

Analisis data

Hasil penelitian isolasi bakteri dari tanah Rhizosfer tanaman kopi robusta sebagai penghasil antibakteri diperoleh berdasarkan pertumbuhan bakteri pada media padat dalam cawan petri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah Tanah kopi Robusta (*Coffea canephora* L.). Penelitian ini diawali dengan mengisolasi bakteri Rhizosfer. Koloni bakteri yng diperoleh dimurnikan pada medium NA dengan kuadran (Afiati and Purnamasari, 2019).



Gambar 1. Hasil pemurnian bakteri Rhizosfer tanah kopi robusta (*Coffea canephora* L.)

Hasil isolasi dari Rhizosfer kopi diperoleh 4 isolat (gambar 1), Pemurnian ini bertujuan untuk memperoleh koloni bakteri tunggal setelah itu dilakukan uji skrining. Dari hasil uji skrining, diperoleh bahwa isolat 4 dapat menghambat bakteri uji: *Escherichia coli* (tabel 1). Isolat ini dilanjutkan proses fermentasi .

Tabel 1. Hasil Uji Zona Hambat Bakteri Rhizosfer Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora* L.)

Kode Isolat	R	Diameter zona hambat (mm)	
		SA	EC
IBRKR	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	+

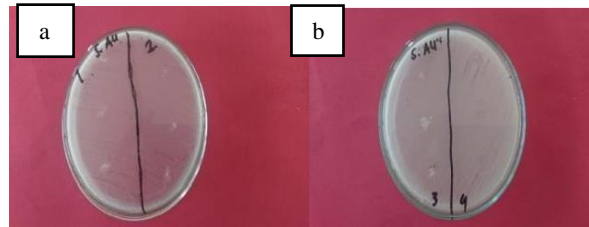
Keterangan:

IBRKR : Isolasi Bakteri Rhizosfer kopi Robusta

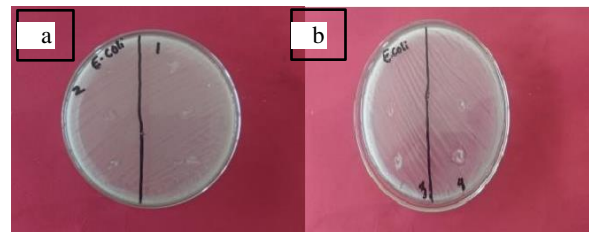
SA : *Staphylococcus aureus*

EC : *Escherichia coli*

R : Replikasi



Hasil Isolasi bakteri *Staphylococcus aureus* pada isolat a)1&2 b)3&4



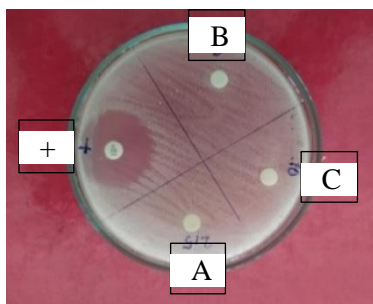
Hasil Isolasi bakteri *Escherichia coli* pada isolat a) 1&2 b) 3&4

Gambar 2. Hasil Uji Zona Hambat Bakteri Rhizosfer Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* & *Escherichia coli*.

Fermentasi sebagai proses oksidasi anaerobik karbohidrat yang menghasilkan alkohol serta beberapa asam (muchtadi, 2010). Tujuan dilakukan fermentasi untuk memperoleh metabolit sekunder dari isolat dalam jumlah yang lebih banyak. Fermentasi dilakukan selama 7 hari dengan cara di-shaker pada kecepatan 200 rpm. Tujuan dilakukan fermentasi selama 7 hari untuk memperoleh metabolit sekunder secara maksimal karena apabila kurang dari 7 hari metabolit sekunder yang diperoleh kurang maksimal dan dapat menimbulkan kerusakan (Letter and Rochelle, 1998). Tujuan shaker yaitu untuk membantu mempercepat mikroba untuk menghasilkan metabolit sekunder dan agar selama fermentasi bakteri akan mencapai fase stasioner dan menghasilkan metabolit sekunder. Untuk mempertahankan hidup, mikroorganisme dapat membuat pertahanan sendiri dengan menghasilkan metabolit sekunder yang mempengaruhi mikroorganisme lain sehingga mikroorganisme lain itu tidak dapat tumbuh dan berkembang biak. Hasil fermentasi dipisahkan supernatannya. Supernatan diekstraksi dengan menggunakan etil asetat dengan metode fraksinasi ekstrak cair cair. Ekstrak yang diperoleh diuapkan hingga diperoleh ekstrak fermentat kental.

Tabel 2. Uji Aktivitas Ekstrak Etil Asetat Isolat aktif Terhadap Bakteri *Escherichia coli*
Diameter Hambatan (mm)

Replikasi	Diameter Hambatan (mm)			
	2,5%	5%	10%	Kontrol Positif
1	6,32	6,33	6,30	16,58
2	6,21	6,38	6,49	15,58
3	6,17	6,18	6,42	20,29
Rata -Rata	6,23	6,29	6,40	17,48



Keterangan :

+ : kontrol positif kloramfenikol

A : konsentrasi 2,5%

B : konsentrasi 5%

C : konsentrasi 10%

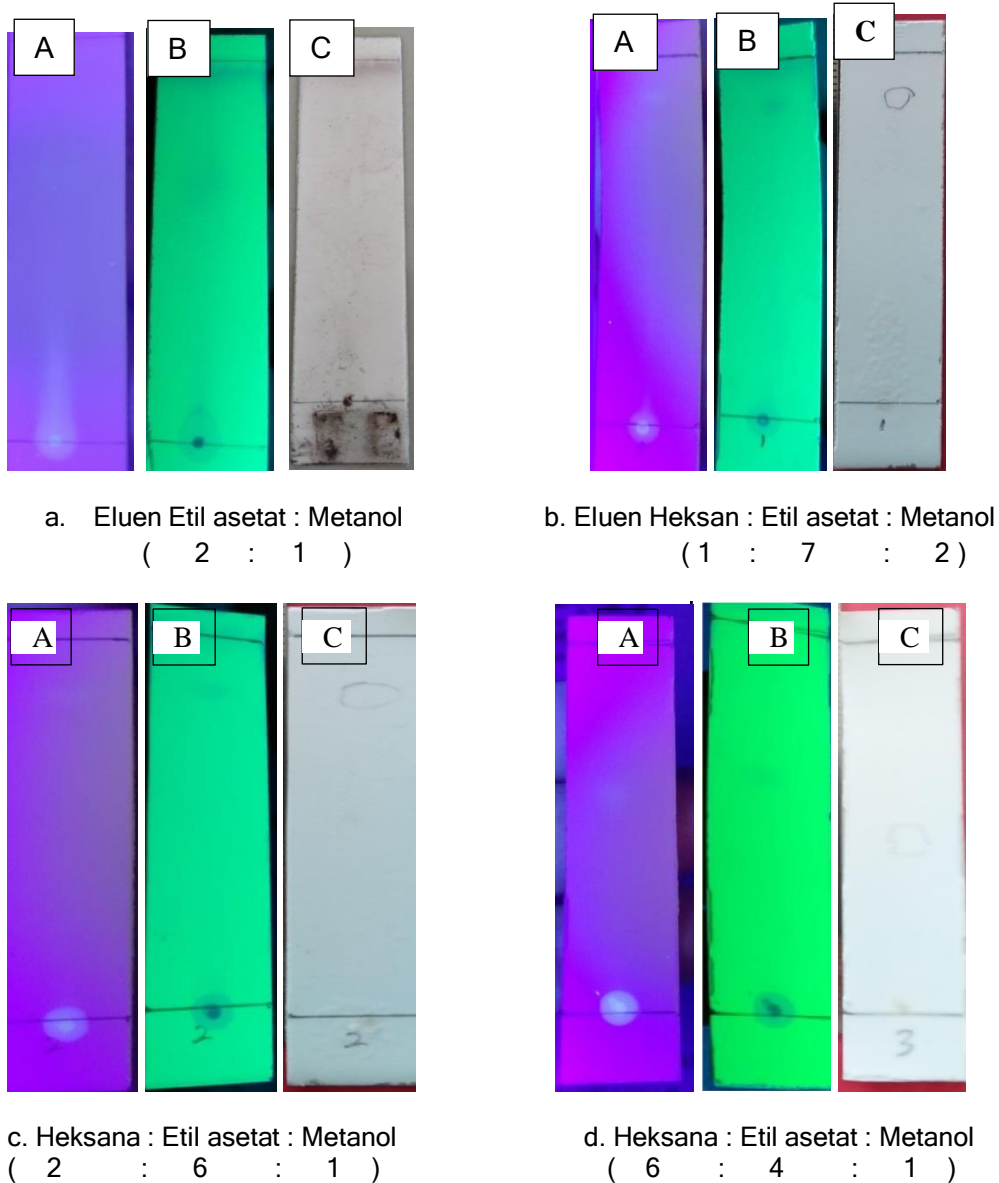
Gambar 3. Uji Aktivitas Ekstrak Etil Asetat Dari Isolat aktif Terhadap Bakteri *E. coli*.

Pengujian aktivitas daya hambat antibakteri menggunakan metode cakram (*paper disk*). Uji aktivitas dengan menggunakan konsentrasi yaitu 2,5%; 5%; 10% terhadap bakteri uji *Escherichia coli* Zona hambat terhadap bakteri uji *Escherichia coli* diperoleh konsentrasi 2,5% yaitu 6,23 mm; 5% yaitu 6,29 mm; Konsentrasi 10% yaitu 6,40% mm; kontrol positif Kloramfenikol yaitu 17,48 Dwidjoseputro (2003) mengemukakan bahwa semakin rendah konsentrasi dari antibakteri maka daya hambatannya akan semakin lemah sehingga zona yang terbentuk akan semakin kecil dan sebaliknya semakin tinggi konsentrasi antibakteri, maka semakin kuat daya hambatannya sehingga semakin besar zona bening yang terbentuk.

Aktivitas antibakteri tergolong lemah ketika zona hambatnya kurang dari 5 mm, tergolong sedang dengan zona hambat 5-10 mm, tergolong kuat apabila zona hambatnya 11-20 mm, dan tergolong sangat kuat apabila zona hambat 20-30 mm (Haniah, 2008).

Tabel 3. Hasil Pengujian Pemisahan Senyawa secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Menggunakan Campuran Eluen a)Etil Asetat : Metanol (2:1), b)Heksan : Etil asetat : metanol (1 : 7 ; 2) c)Heksan : Etil asetat : Metanol (2 : 6 : 1) d)Heksan :Etil asetat : metanol (6 : 4 : 1)

Bercak	Penampakan Bercak					
	UV 254		UV 366		H ₂ SO ₄ 10%	
	Rf	Warna	Rf	Warna	Rf	Warna
Ekstrak Etil Asetat	-	-	-	-	-	-



Keterangan :

A : ekstrak etil asetat pada lampu uv 366

B : ekstrak etil asetat pada lampu uv 254

C : penyemprotan H₂SO₄

Gambar 4. Profil kromatografi Ekstrak Etil Asetat dari Isolat aktif

Ekstrak etil asetat isolat 4 diidentifikasi dengan profil KLT dengan menggunakan 4 jenis larutan pengembang (eluen) yaitu Etil Asetat : Metanol (2 : 1), heksana : etil asetat : Metanol (1 : 7 : 2), heksana : etil asetat : Metanol (2 : 6 : 1) dan heksana : etil asetat : Metanol (6 : 4 : 1) dimana eluen-eluen ini merupakan larutan yang bersifat semipolar, sehingga bercak yang terlihat pada kromatogram KLT dapat terpisah dengan baik karena larutan pengembang yang digunakan dapat menarik senyawa yang bersifat polar sampai semi polar (Harborne, 1996). Keakuratan hasil pemisahan dalam metode kromatografi

bergantung pada pemilihan pelarut yang sesuai dengan fase diam, kepolaran pelarut atau pemilihan pelarut yang sesuai sebagai fase gerak, ukuran kolom relative terhadap jumlah material yang akan dipisahkan dan laju elusi atau lairan fase gerak (Harborne, 1996). Berdasarkan hasil identifikasi KLT menunjukkan bahwa ekstrak Etil asetat dengan berbagai larutan pengembang atau eluen tidak menunjukkan noda pada lempeng KLT baik setelah di visualisasi dengan UV 254 nm, UV 366 nm dan pereaksi semprot H₂SO₄ 10% sehingga secara identifikasi ekstrak etil asetat tidak terdapat senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antimikroba.

KESIMPULAN

Hasil penelitian isolasi Rhizosfer tanah kopi robusta (*Coffea canephora* L.) diperoleh 4 isolat dan satu isolat yang memiliki aktivitas penghambat pada bakteri *Escherichia coli* terbesar yaitu isolat 4 dan konsentrasi 10% memiliki diameter hambatan terbesar terhadap bakteri *Escherichia coli* yaitu 6,40 mm namun tidak dapat teridentifikasi pada metode KLT.

DAFTAR PUSTAKA

- Afiati, I. and Purnamasari, R.T. (2019) 'Pengaruh pemberian bakteri endofit terhadap pertumbuhan dan hasil tanaman terung ungu (*Solanum melongena* L)', *J. Agroteknologi Merdeka Pasuruan*, 3(1), pp. 32-37.
- Dwidjoseputro, 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djabatan: Jakarta
- Fatmawati, Umi., 2015., *Actinomycet : Mikroorganisme potensial untuk pengembangan PGPR dan Biokontrol hayati di Indonesia*. Seminar nasional XX pendidikan biologi FKIP UNS. Surakarta.
- Haniah, M. (2008) 'Isolasi jamur endofit dari daun sirih (*Piper betle* L.) sebagai antimikroba terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*', *Skripsi*, 12(5), pp. 110-119.
- Harborne, J.B., 1996, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Diterjemahkan oleh kokasih Padmawinata dan Imam Sudiro, Edisi II. ITB. Bandung.
- Hasanuddin, R., Jasmiadi, J. and Abdillah, N. (2021) 'The Analysis of the Chlorogenic Acid in the Ethanol Fraction of Robusta Coffee Beans and Its Effect on Glucose Levels in Wistar Rats', *Disease Prevention and Public Health Journal*, 15(2), p. 118. Available at: <https://doi.org/10.12928/dpphj.v15i2.4705>.
- Kemenkes RI (2011) *Farmakope Herbal Indonesia Edisi I 2011 Kementerian Kesehatan Republik Indonesia*.
- Kementrian kesehatan RI. 2017. *Mikrobiologi*. Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber daya manusia Kesehatan
- Letter, T.M. and Rochelle, N. (1998) *Antimicrobial*.
- Mal, R., Radiati, L.E. dan Purwadi., 2013. Effect of storage duration in refrigerator temperature on pH value, viscosity, total lactic acid and profiles protein dissolved of goat milk kefir. Universitas brawijaya. Malang.

- Muchtadi, tien R, dkk. 2010. Ilmu pengetahuan pangan. Bandung: Alfabeta
- Radji, M. (2005) 'Peranan Bioteknologi Dan Mikroba Endofit Dalam Pengembangan Obat Herbal', *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2(3), pp. 113-126. Available at: <https://doi.org/10.7454/psr.v2i3.3388>.
- Utami, E.R. (2012) 'Antibiotika, Resistensi, Dan Rasionalitas Terapi', *Sainstis*, 1(4), pp. 191-198. Available at: <https://doi.org/10.18860/sains.v0i0.1861>.
- Widjayanti, V. N., 1999. Obat-Obatan. Penerbit Kanisius: Yogyakarta
- World Healt Organization, 2020. Antimicrobial Resistance