

Potensi Bakteri *Bacillus* sp. dari Rhizosfer Rumput Paitan di Kawasan Hutan De Djawatan Banyuwangi dalam Menghambat Bakteri Patogen *Staphylococcus aureus*

The Potential of *Bacillus* Sp. From Rhizosphere of Paitan Grass in De Djawatan Banyuwangi Forest Area in Inhibiting Pathogenic Bacteria *Staphylococcus aureus*

I Putu Krisna Wijaya^{1*}, Retno Kawuri², I Made Sara Wijana³, Dinda Nur Malik Insani⁴

^{1,2,3})Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Bali

*Email: putukrisna1611@gmail.com

INTISARI

Staphylococcus aureus merupakan mikrobiota normal yang dapat menjadi patogen resisten antibiotik. Mengatasi resistensi antibiotik oleh *S. aureus* perlu ditanggulangi dengan menemukan isolat bakteri antagonis penghasil antibiotik. Bakteri *Bacillus* sp. biasanya ditemukan di rhizosfer tanaman serta mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen, Keberadaan *Bacillus* sp. pada rhizosfer rumput paitan serta potensinya dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* masih belum terungkap. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan isolat *Bacillus* sp. pada rhizosfer rumput paitan dan mengetahui potensi *Bacillus* sp. dalam menghambat patogen *S. aureus*. Pengambilan sampel pada penelitian dilakukan di hutan Djawatan Banyuwangi. *Plating method* dengan teknik *pour plate* merupakan metode yang digunakan pada penelitian ini, serta uji daya hambat dengan metode *dual culture*. Hasil menunjukkan ditemukannya 12 isolat *Bacillus* sp. dari 5 titik lokasi yang diidentifikasi berdasarkan buku Bergey's Manual. Daya hambat terbaik dihasilkan oleh isolat *Bacillus* sp.2 dengan diameter zona hambat sebesar 11,92 mm. Berdasarkan hasil penelitian, *Bacillus* sp. memiliki potensi sebagai agen antagonis untuk menghambat *S. aureus*.

Kata kunci: potensi, daya hambat, resistensi, antibiotik

ABSTRACT

The problem that arises today, namely the existence of bacteria that are resistant to antibiotics, one of which is *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* is a normal microbiota bacterium, but can act as a pathogenic bacterium and can cause common to broad-spectrum diseases. Antibiotic resistance by *S. aureus* needs to be overcome by finding antibiotic-producing antagonistic bacterial isolates. *Bacillus* sp. bacteria are known to be usually found in the rhizosphere of plants and can inhibit the growth of pathogenic bacteria, but it is not yet known whether *Bacillus* sp. can be found in the rhizosphere of paitan grass and whether it can inhibit *S. aureus*. This study aims to find *Bacillus* sp. isolates in the rhizosphere of paitan grass and determine the potential of *Bacillus* sp. in inhibiting the pathogen *S. aureus*. Sampling in this study was conducted in the forest of Djawatan Banyuwangi. *Plating method* with *pour plate* technique is the method used in this research, and inhibition test with *dual culture* method. The results showed the discovery of 12 isolates of *Bacillus* sp. from 5 location points identified based on Bergey's Manual. The best inhibition was produced by *Bacillus* sp.2 isolates with an inhibition zone diameter of 11,92 mm. Based on the results of the study, *Bacillus* sp. has the potential as an antagonistic agent to inhibit *S. aureus*.

Keyword: potential, inhibition, resistance, antibiotics

PENDAHULUAN

Hutan sebagai salah satu kekayaan alam Indonesia memiliki keanekaragaman yang melimpah baik flora maupun fauna (Setiadi dkk., 2023). Hutan di Indonesia yang mempunyai keanekaragaman yang baik salah satunya adalah hutan De Djawatan, Banyuwangi. Hutan De Djawatan juga termasuk hutan yang memiliki kondisi tanah yang subur dan sistem drainase yang baik (Rosyidah dkk., 2024). Keanekaragaman yang baik serta kondisi tanah yang subur membuat hutan menjadi habitat potensial bagi kehidupan mikroorganisme.

Mikroorganisme tanah, khususnya bakteri merupakan salah satu bagian penting dalam ekosistem daratan. Menurut Yunus dkk. (2017), mikroorganisme tanah memiliki banyak fungsi dalam ekosistem. Rhizosfer atau wilayah perakaran pada tanaman merupakan habitat yang kaya akan nutrisi dan mikroorganisme tanah ini (Sari, 2015). Rhizosfer dari rumput *Axonopus compressus* menjadi salah satu tanaman yang dapat ditemukannya keberadaan dari mikroorganisme tanah ini. Salah satu contoh mikroorganisme tanah yang sering dijumpai pada rhizosfer perakaran tanaman *A. compressus* adalah *Bacillus* sp. Salah satu penelitian dari Sa'adah (2023), menyebutkan bahwa jenis bakteri *Bacillus* sp. tergolong dalam bakteri Gram positif dengan bentuk batang yang memiliki kemampuan menghasilkan senyawa antimikroba yang terdiri dari basitrasin, basilin, dan basilomisin.

Permasalahan yang timbul saat ini, yaitu adanya beberapa bakteri patogen Gram positif yang resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik. *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri patogen jenis Gram positif yang sering dijumpai. Jenis bakteri *S. aureus* termasuk dalam kategori Gram positif, dengan morfologi bulat dan diameter yang berkisar antara 0,7 sampai 1,2 μm . Bakteri ini umumnya ditemukan dalam susunan kelompok yang tidak beraturan, menyerupai bentuk buah anggur, tidak sporogenik, dapat beradaptasi pada kondisi aerob dan anaerob, serta tidak memiliki kemampuan untuk bergerak. Suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 37°C (Rianti dkk., 2022). *S. aureus* selain berperan sebagai *flora normal* juga dapat sebagai patogen penyebab meningkatnya jumlah penyakit dan kematian (Rahman dkk., 2018).

Salah satu tantangan dalam pengobatan infeksi oleh *S. aureus* adalah adanya *Methicillin Resistant S. aureus* (MRSA) yaitu resistensi *S. aureus* terhadap antibiotik (Rianti dkk., 2022). *S. aureus* dapat menimbulkan penyakit infeksi biasa sampai dengan penyakit yang berspektrum luas (Mardiah, 2017). Berdasarkan penelitian dari Aziz dkk. (2022), *S. aureus* resisten terhadap beberapa antibiotik, antara lain cefixim, ampicilin, dan oksitetrasiklin. Resistensi beberapa antibiotik oleh *S. aureus* ini perlu ditanggulangi dengan cara menemukan isolat bakteri antagonis penghasil antibiotik. Salah satu bakteri yang dapat sebagai agen antagonis adalah *Bacillus* sp. Berdasarkan penelitian dari Flori dkk. (2020), didapatkan hasil bahwa bakteri *Bacillus* sp. dapat menghambat *Fusarium* sp. Berdasarkan permasalahan di atas terkait resistensi beberapa antibiotik oleh *S. aureus*, maka perlu dilakukan eksplorasi dan penelitian untuk mencari *Bacillus* sp. sebagai agen antagonis penghasil antibiotik lain.

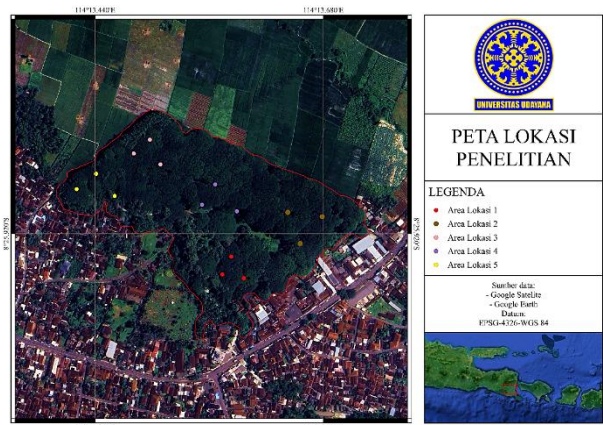
BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana. Penelitian dimulai pada bulan November hingga Januari 2025.

Pengambilan Sampel Tanah

Pengambilan sampel tanah dilakukan pada lima titik lokasi yang berbeda, dimana pada tiap lokasi terdapat tiga titik pengambilan sampel, yaitu Lokasi I (L.I.A, L.I.B, L.I.C), Lokasi II (L.II.A, L.II.B, L.II.C), Lokasi III (L.III.A, L.III.B, L.III.C), Lokasi IV (L.IV.A, L.IV.B, L.IV.C), dan Lokasi V (L.V.A,

L.V.B, L.V.C) yang semuanya diambil pada wilayah rumput paitan. Sampel tanah yang diambil merupakan bagian permukaan tanah dan bagian potongan akar rumput atau rhizosfer rumput di dalamnya. Sampel tanah rhizosfer rumput paitan diambil pada kedalaman tanah 15-20 cm sebanyak 100 g dan dimasukkan ke dalam plastik klip. Sampel disimpan pada tas plastik dan dimasukkan ke dalam kotak kardus dengan suhu ruang 28°C hingga nanti sampai di Laboratorium. Titik-titik pengambilan sampel rhizosfer tanah yang dilakukan di Hutan De Djawatan Banyuwangi berdasarkan titik koordinat seperti pada Tabel 1, serta peta lokasi pengambilan sampel dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Peta Pengambilan Sampel Tanah

Tabel 1. Titik koordinat lokasi pengambilan sampel tanah di Hutan De Djawatan

Nama Lokasi	Titik Lokasi Pengambilan Sampel	Titik Koordinat
Lokasi 1	L.I.A	8°25'58"S 114°13'35"E
	L.I.B	8°25'59"S 114°13'36"E
	L.I.C	8°25'59"S 114°13'34"E
Lokasi 2	L.II.A	8°25'54"S 114°13'40"E
	L.II.B	8°25'55"S 114°13'41"E
	L.II. C	8°25'55"S 114°13'39"E
Lokasi 3	L.III.A	8°25'49"S 114°13'32"E
	L.III.B	8°25'50"S 114°13'33"E
	L.III.C	8°25'50"S 114°13'31"E
Lokasi 4	L.IV.A	8°25'54"S 114°13'34"E
	L.IV.B	8°25'55"S 114°13'35"E
	L.IV.C	8°25'55"S 114°13'33"E
Lokasi 5	L.V.A	8°25'52"S 114°13'28"E
	L.V.B	8°25'52"S 114°13'29"E
	L.V.C	8°25'52"S 114°13'26"E

Isolasi Sampel Tanah

Sampel dari masing-masing lokasi dikomposit menjadi satu pada tiap lokasinya. Proses untuk melakukan isolasi bakteri *Bacillus* sp. dapat dilakukan dengan menimbang 10 g sampel tanah beserta rhizosfer, langkah berikutnya dapat memasukkan sampel tanah ke dalam 90 mL *aquadest* steril sehingga didapat tingkat pengenceran 10^{-1} . Tabung reaksi berisi 9 mL *aquadest* steril lainnya dimasukkan sebanyak 1 mL hasil pengenceran 10^{-1} sehingga diperoleh suspensi pengenceran 10^{-2} . Metode yang sama juga dilakukan pada tabung reaksi berikutnya sehingga didapatkan faktor pengenceran 10^{-3} . Pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} yang telah dihasilkan dilakukan proses pemanasan dengan oven selama 20 menit pada suhu 80°C . Tahap selanjutnya suspensi pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} ditanam pada media *Yeast Extract Malt Agar* (YEMA) dengan metode *pour plate* serta diinkubasi secara terbalik selama 24 jam pada suhu 37°C . Isolat bakteri yang diduga *Bacillus* sp. yang tumbuh pada media YEMA, kemudian dilakukan *streak for a single colony*.

Identifikasi Koloni Bakteri *Bacillus* sp.

Identifikasi dilakukan pada koloni bakteri *Bacillus* sp. secara makroskopis, mikroskopis, pewarnaan Gram, dan uji katalase. Pengamatan secara langsung dapat dilakukan sebagai identifikasi secara makroskopis koloni dengan memperhatikan bentuk, warna, ukuran, bentuk permukaan, dan pinggiran koloni. (Leboffe, 2012). Pengamatan secara mikroskopis dapat dilakukan dengan pewarnaan Gram dan uji katalase.

Peremajaan dan Reidentifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Isolat bakteri *S. aureus* yang dipergunakan dalam proses penelitian ini diperoleh dari stok kultur Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi Biologi, Universitas Udayana. Bakteri dibiakkan kembali pada media MSA atau *Mannitol Salt Agar* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Konfirmasi *S. aureus* dapat dilihat dari koloni yang berwarna kuning pada media MSA dan konfirmasi lebih lanjut dilakukan dengan melakukan pewarnaan Gram dan uji katalase, serta untuk menduga kepadatan sel dilakukan dengan membandingkan dengan larutan standar Mc Farland (1×10^7 - 1×10^8 sel/mL).

Uji Daya Hambat *Bacillus* sp. terhadap *Staphylococcus aureus*

Uji daya hambat *Bacillus* sp. terhadap *S. aureus* menggunakan metode *dual culture*. Bakteri *S. aureus* ditumbuhkan di atas media NA (*Nutrient Agar*) dengan metode *swab* dan didiamkan selama 10-15 menit, kemudian digunakan alat pelubang *cork borer* untuk membuat sumur difusi dengan diameter 5 mm. Isolat *Bacillus* sp. yang telah dibiakkan pada media *Nutrient Broth* dipipet sebanyak 20 μL dan dimasukkan pada sumur difusi, lalu diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Kontrol positif yang dipakai adalah antibiotik *Ciprofloxacin* konsentrasi 1%. Antibiotik yang telah larut dimasukkan ke dalam sumur difusi sebanyak 20 μL . Setelah proses inkubasi, zona bening yang dihasilkan di sekitar isolat *Bacillus* sp. dan kontrol positif diamati dan diukur kemudian dibandingkan. Setiap perlakuan pada uji daya antibakteri dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

Pengolahan Data

Data kuantitatif yang didapat dari pengujian daya hambat isolat *Bacillus* sp. dari rhizosfer rumput paitan terhadap *S. aureus* dengan metode *dual culture* dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan *software SPSS for windows version 30.0* tahun 2025. Uji *Duncan* dapat dilakukan sebagai uji lanjutan apabila terdapat sebuah perbedaan dari setiap perlakuan.

HASIL**Jumlah Isolat *Bacillus* sp. yang Ditemukan**

Tabel 2. dapat dilihat sebagai data jumlah isolat *Bacillus* sp. yang ditemukan pada 5 titik lokasi berjumlah 12 isolat dengan karakteristik morfologi koloni yang berbeda-beda.

Tabel 2. Jumlah *Bacillus* sp. yang ditemukan pada Lokasi Pengambilan Sampel

No	Lokasi	Jumlah Isolat
1	Lokasi 1	3
2	Lokasi 2	4
3	Lokasi 3	2
4	Lokasi 4	2
5	Lokasi 5	1

Keterangan : Isolat yang ditemukan dari seluruh lokasi, yaitu lokasi I sampai V terdapat beberapa isolat yang memiliki kesamaan, yaitu *Bacillus* sp.4 pada lokasi II memiliki kesamaan dengan *Bacillus* sp.8 pada lokasi III. Kemudian, *Bacillus* sp.7 pada lokasi II memiliki kesamaan dengan *Bacillus* sp.11 pada lokasi IV.

Pengukuran pH Tanah, Ketinggian Lokasi, dan Suhu Lingkungan

Rata-rata pH tanah setiap lokasi pengambilan sampel dari lokasi 1 sampai dengan lokasi 5 dapat dilihat pada Tabel 3. Lokasi I memiliki pH paling tinggi yaitu 6,9. Sementara itu, lokasi V mempunyai rata-rata pH paling kecil jika dibandingkan dengan lokasi lain yakni 6,3.

Tabel 3. Hasil Pengukuran pH Tanah Lokasi Pengambilan Sampel

No	Lokasi	pH
1	I	6,9
2	II	6,7
3	III	6,5
4	IV	6,5
5	V	6,3

Pengukuran ketinggian (MDPL) setiap lokasi dilakukan menggunakan *Google Earth* dengan hasil dapat dilihat pada Tabel 4. Titik lokasi dengan ketinggian tertinggi adalah Lokasi V yakni 83 meter, sedangkan ketinggian terendah yaitu Lokasi II sebesar 76 meter.

Tabel 4. Hasil Pengukuran Ketinggian Tanah Lokasi Pengambilan Sampel

No	Lokasi	Ketinggian (MDPL)
1	I	79
2	II	76
3	III	80
4	IV	77
5	V	83

Suhu setiap lokasi diukur menggunakan aplikasi *AccuWeather* dengan hasil dapat dilihat pada Tabel 5. Titik lokasi dengan suhu tertinggi adalah Lokasi V yakni 31°C, sedangkan suhu terendah yaitu Lokasi I yaitu 28°C.

Tabel 5. Hasil Pengukuran Suhu Lingkungan Lokasi Pengambilan Sampel

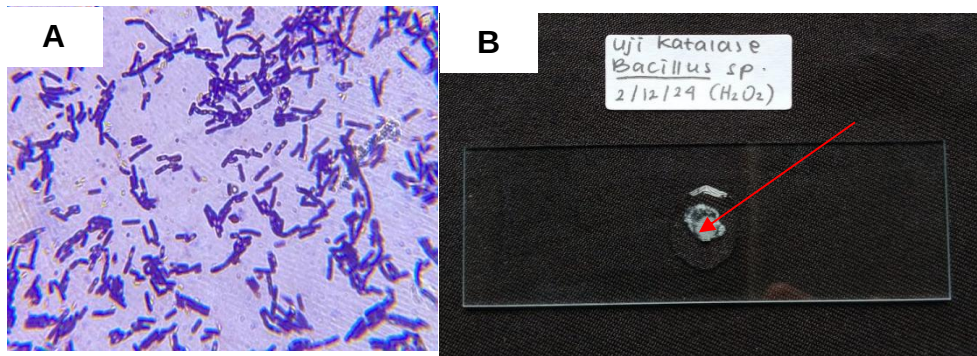
No	Lokasi	Suhu (°C)
1	I	28
2	II	29
3	III	29
4	IV	30
5	V	31

Identifikasi Isolat *Bacillus* sp.

Pewarnaan Gram dan uji katalase 12 isolat *Bacillus* sp. yang ditemukan dari 5 titik lokasi di Hutan Djawatan Banyuwangi dapat dilihat pada Tabel 6. Bakteri dengan hasil pewarnaan Gram positif dan uji katalase positif menunjukkan sel secara mikroskopik berwarna ungu merupakan isolat *Bacillus* sp. Hasil positif uji katalase dan pewarnaan Gram dapat dilihat pada Gambar 2. Tabel 7. dapat dilihat sebagai hasil identifikasi karakteristik makroskopis dan mikroskopis *Bacillus* sp. yang ditemukan dari setiap lokasi, serta Tabel 8. merupakan hasil pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis *Bacillus* sp. yang ditemukan.

Tabel 6. Hasil Pewarnaan Gram dan Uji Katalase Isolat *Bacillus* sp.

No	Spesies	Lokasi	Pewarnaan Gram	Uji Katalase
1	<i>Bacillus</i> sp. 1	I	G+	+
2	<i>Bacillus</i> sp. 2	I	G+	+
3	<i>Bacillus</i> sp. 3	I	G+	+
4	<i>Bacillus</i> sp. 4	II	G+	+
5	<i>Bacillus</i> sp. 5	II	G+	+
6	<i>Bacillus</i> sp. 6	II	G+	+
7	<i>Bacillus</i> sp. 7	II	G+	+
8	<i>Bacillus</i> sp. 8	III	G+	+
9	<i>Bacillus</i> sp. 9	III	G+	+
10	<i>Bacillus</i> sp. 10	IV	G+	+
11	<i>Bacillus</i> sp. 11	IV	G+	+
12	<i>Bacillus</i> sp. 12	V	G+	+



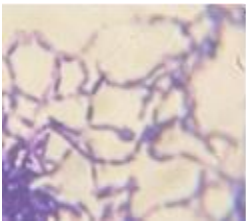
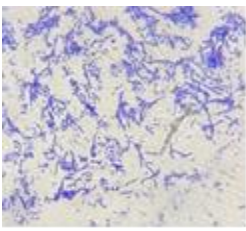
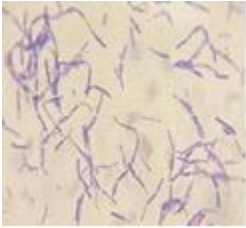
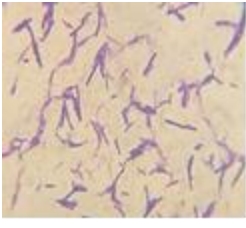
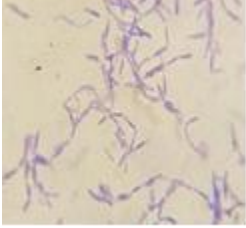
Gambar 2. *Bacillus* sp. dengan perbesaran 1000x: (A) Hasil Pewarnaan Gram; (B) Uji Katalase

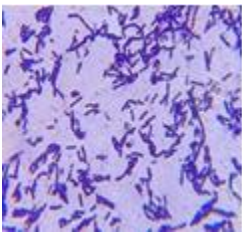
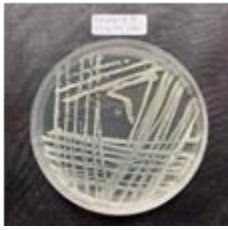
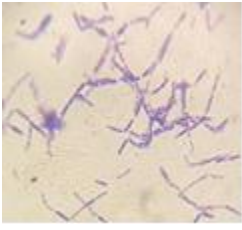
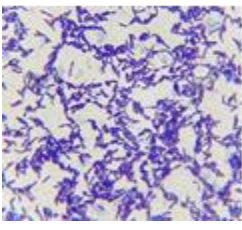
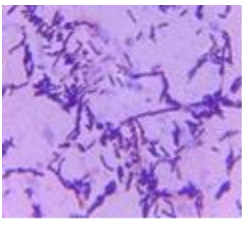
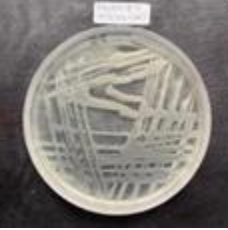
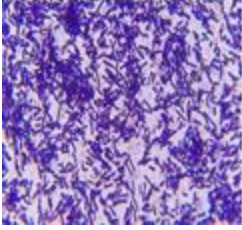
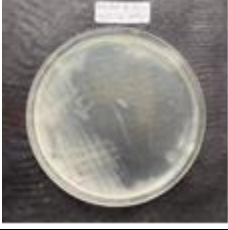
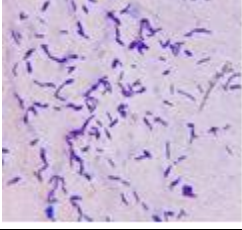
Tabel 7. Hasil Identifikasi Karakter Makroskopik dan Mikroskopik Isolat *Bacillus* sp. yang ditemukan pada 5 titik lokasi.

Karakter Isolat	Spesies <i>Bacillus</i> sp.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I. Karakter Makroskopis												
a. Warna koloni												
Putih												
b. Permukaan koloni												
Rata												
Tidak beraturan												
c. Pinggiran koloni												
Rata												
Berserabut												
Bergelombang												
d. Bentuk koloni												
Bulat												
Tidak beraturan												
Berbentuk rhizoid												
II. Karakter Mikroskopis												
a. Bentuk ujung sel												
Membulat												
Flat (datar)												

Keterangan : Warna hitam menunjukkan karakter yang sesuai dengan spesies *Bacillus*, serta penentuan karakter makroskopis dan mikroskopis, mengikuti sebagian besar ciri-ciri dari Logan and De Vos (2009).

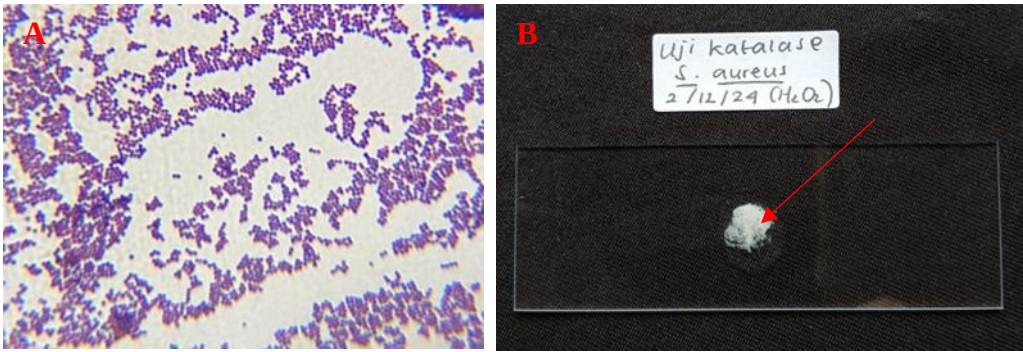
Tabel 8. Gambar Makroskopik dan Mikroskopik *Bacillus* sp. yang ditemukan dari Setiap Lokasi

No	Spesies	Gambar Makroskopis	Gambar Mikroskopis
1	<i>Bacillus</i> sp. 1		
2	<i>Bacillus</i> sp. 2		
3	<i>Bacillus</i> sp. 3		
4	<i>Bacillus</i> sp. 4		
5	<i>Bacillus</i> sp. 5		
6	<i>Bacillus</i> sp. 6		

No	Spesies	Gambar Makroskopis	Gambar Mikroskopis
7	<i>Bacillus</i> sp. 7		
8	<i>Bacillus</i> sp. 8		
9	<i>Bacillus</i> sp. 9		
10	<i>Bacillus</i> sp. 10		
11	<i>Bacillus</i> sp. 11		
12	<i>Bacillus</i> sp. 12		

Reidentifikasi *Staphylococcus aureus*
Berdasarkan identifikasi secara mikroskopik didapatkan hasil bakteri *S. aureus* memiliki ciri-ciri bakteri berbentuk seperti buah anggur (bulat tidak teratur) dan berwarna ungu yang bersifat Gram positif.

Sementara itu, hasil uji katalase menggunakan Hidrogen Peroksida (H_2O_2) diperoleh hasil positif. Gambar 3 merupakan hasil pewarnaan Gram dan uji katalase.



Gambar 3. *Staphylococcus aureus* dengan perbesaran 1000x : (A) Hasil Pewarnaan Gram; (B) Uji Katalase

Uji Daya Hambat *Bacillus* sp. terhadap *Staphylococcus aureus*

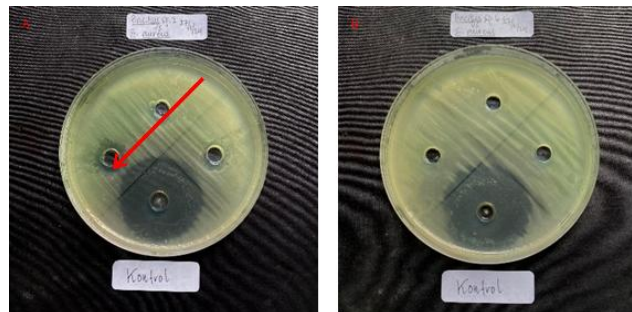
Uji daya hambat *Bacillus* sp. yang ditemukan dari 5 titik lokasi untuk hasilnya dapat dilihat pada Tabel 9. Isolat dengan daya hambat paling tinggi adalah *Bacillus* sp.2 (11,92 mm), sedangkan yang memiliki daya hambat paling kecil yaitu *Bacillus* sp.1 (7,25 mm) serta spesies yang tidak memiliki daya hambat yakni *Bacillus* sp.5, *Bacillus* sp.6, *Bacillus* sp.8, *Bacillus* sp.9, *Bacillus* sp.10, *Bacillus* sp.11, dan *Bacillus* sp.12. Gambar uji daya hambat *Bacillus* sp.2 dan *Bacillus* sp.6 dapat dilihat pada Gambar 4.

Tabel 9. Hasil Uji Daya Hambat *Bacillus* sp. terhadap *Staphylococcus aureus*

No.	Spesies	Lokasi	Rata-rata (mm)	Kategori Daya Hambat (Davis and Stout, 1971)
1	<i>Bacillus</i> sp.1	Lokasi 1	7,25±7,79 ^b	Sedang
2	<i>Bacillus</i> sp.2	Lokasi 1	11,92±4,05 ^b	Kuat
3	<i>Bacillus</i> sp.3	Lokasi 1	7,50±4,56 ^b	Sedang
4	<i>Bacillus</i> sp.4	Lokasi 2	10,00±4,55 ^b	Sedang
5	<i>Bacillus</i> sp.5	Lokasi 2	0,00±0,00 ^a	-
6	<i>Bacillus</i> sp.6	Lokasi 2	0,00±0,00 ^a	-
7	<i>Bacillus</i> sp.7	Lokasi 2	10,00±4,92 ^b	Sedang
8	<i>Bacillus</i> sp.8	Lokasi 3	0,00±0,00 ^a	-
9	<i>Bacillus</i> sp.9	Lokasi 3	0,00±0,00 ^a	-
10	<i>Bacillus</i> sp.10	Lokasi 4	0,00±0,00 ^a	-
11	<i>Bacillus</i> sp.11	Lokasi 4	0,00±0,00 ^a	-

No.	Spesies	Lokasi	Rata-rata (mm)	Kategori Daya Hambat (Davis and Stout, 1971)
12	<i>Bacillus</i> sp.12	Lokasi 5	0,00±0,00 ^a	-
13	<i>Ciprofloxacin</i> 1%	KTL (+)	25,58±0,95 ^c	Sangat kuat

Keterangan : Perlakuan dengan huruf yang sama menunjukkan data tidak berbeda nyata, sebaliknya perlakuan dengan huruf yang berbeda menunjukkan data berbeda nyata α 5 dengan rata-rata 3 kali ulangan



Gambar 4. (A) *Bacillus* sp.2 dan (B) *Bacillus* sp.6

PEMBAHASAN

Isolat *Bacillus* sp. ditemukan pada rhizosfer rumput paitan (*A. compressus*) pada kedalaman tanah 15-20 cm. Hal ini dikarenakan *Bacillus* sp. tergolong bakteri PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) atau bakteri yang mengkolonisasi daerah perakaran tanaman (rhizosfer) dan dapat sebagai agen antagonis (Sulistyoningtyas dkk., 2017). Penelitian terkait potensi *Bacillus* sp. yang ditemukan pada rhizosfer tanaman sebagai agen antagonis juga pernah dilakukan oleh Cahya dkk., (2022) dengan total temuan 6 isolat *Bacillus* sp. Bakteri *Bacillus* sp. dalam pertumbuhannya sangat dipengaruhi oleh ketinggian tanah, pH, dan suhu. *Bacillus* sp. memiliki suhu optimal dalam pertumbuhannya yaitu berkisar pada 30-37°C (Hadimani and Kulkarni, 2017). Faktor lingkungan berikutnya yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah pH. Lokasi pengambilan sampel memiliki rentang pH yaitu 6,3-6,9. pH optimum untuk pertumbuhan bakteri *Bacillus* sp. antara pH 6 - 8, sedangkan pH minimumnya pada pH 4,3 (Fitria dan Zulaika, 2018). Pengukuran ketinggian lokasi pengambilan sampel pada penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata ketinggian lokasi pengambilan sampel berkisar pada 76-83 meter. Ketinggian tanah merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberadaan mikroba tanah. Hal ini dikarenakan, ketinggian tanah akan mempengaruhi sifat-sifat tanah seperti: kandungan TN (*total nitrogen*), TOC (*total organic carbon*), kadar air, C/N (perbandingan massa *carbon* dan *nitrogen*), urease yang akan menurun dengan bertambahnya ketinggian tanah (Tang *et al.*, 2020).

Pewarnaan Gram dan uji katalase dapat dilakukan sebagai uji konfirmasi isolat yang diduga bakteri *Bacillus* sp. Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengamati morfologi sel bakteri di bawah mikroskop, serta untuk mengetahui jenis Gram positif atau negatif pada bakteri (Nurhidayati dkk., 2015). Hasil identifikasi isolat diduga bakteri *Bacillus* sp. secara mikroskopis di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x menunjukkan koloni bakteri berbentuk batang (*basil*) baik bentuk batang pendek hingga batang tunggal dan bersifat Gram positif (Karunia dkk., 2021). Hasil uji katalase menunjukkan bakteri *Bacillus* sp. mampu menghasilkan gelembung setelah ditetaskan pereaksi hidrogen peroksida, sehingga bakteri bersifat katalase positif. Bakteri positif katalase dikarenakan bakteri ini mempunyai enzim katalase yang mampu memecah hidrogen peroksida sehingga terbentuk gelembung (Karimela dkk., 2018).

Penelitian ini melakukan identifikasi bakteri *Bacillus* sp. secara makroskopis dan mikroskopis. Isolat *Bacillus* sp. yang ditemukan pada penelitian ini memiliki koloni berwarna putih. Hasil ini sesuai dengan penelitian dari Handayani dkk. (2023), dimana koloni makroskopis bakteri *Bacillus* sp. memiliki warna putih atau krem dengan bentuk koloni *circular* (bulat), *filamentous* (berbenang), *curled* (melengkung), dan *amoboid*. Karakter mikroskopis isolat *Bacillus* sp. pada penelitian ini diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x. Secara mikroskopis bakteri *Bacillus* sp. memiliki bentuk batang (*basil*). Hasil ini sesuai dengan penelitian dari Karunia dkk. (2021), bahwa koloni *Bacillus* sp. secara mikroskopis berbentuk batang (*basil*) baik bentuk batang pendek hingga batang tunggal dan bersifat Gram positif.

Hasil pengujian daya hambat bakteri *Bacillus* sp. terhadap *S. aureus* mendapatkan hasil nilai yang beragam. Hasil penelitian ini sesuai dengan Putra dkk. (2017), menyatakan bahwa ada spesies dari *Bacillus* seperti *B. subtilis*, *B. firmus*, *B. brevis*, dan *B. licheniformis* memiliki kemampuan antibakteri terhadap *S. aureus*. Diameter zona hambat yang dihasilkan pada penelitian ini dapat dikategorikan dalam beberapa kelompok. Kategori daya hambat ini menurut Davis and Stout (1971), kekuatan aktivitas daya hambat terdiri atas empat kategori, yaitu kategori lemah dengan diameter (<6 mm), kategori sedang (6-10 mm), kategori kuat (11-20 mm), dan kategori sangat kuat (>20 mm).

Perbedaan hasil uji daya hambat setiap isolat dapat disebabkan oleh jenis media yang digunakan saat pengujian kurang bisa memberikan nutrisi secara maksimal pada *Bacillus* sp. Hal ini akan menyebabkan produksi metabolit sekunder juga menjadi tidak maksimal. Menurut Kabir *et al.* (2017), beberapa media untuk pertumbuhan *Bacillus* sp. yaitu *mannitol egg yolk polymyxin* (MYP) dan *polymyxin egg yolk mannitol bromothymol blue agar* (PEMBA). Media lainnya yang dapat ditumbuhi oleh *Bacillus* sp. adalah media umum *Nutrient Agar* (NA) dan *Nutrient Broth* (NB) (Napitupulu dkk., 2019). Perbedaan hasil daya hambat juga dipengaruhi oleh metabolit sekunder yang dimiliki oleh tiap isolat. Metabolit sekunder merupakan senyawa organik yang dihasilkan organisme, salah satunya bakteri yang tidak memiliki fungsi esensial. Antibiotik merupakan salah satu dari metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. Beberapa jenis antibiotik yang dapat dihasilkan oleh *Bacillus* sp. antara lain: *Tyrothricin*, *Tyrocidine*, *Gramicidine*, *Bacitracine*, *Polymyxine*, dan *Viomycin* (Nurmiati dkk., 2024). Variasi metabolit sekunder ini salah satu faktor perbedaan daya hambat yang dihasilkan setiap spesies *Bacillus* sp. pada penelitian ini (Harir *et al.*, 2018). Oleh karena itu, kemampuan *Bacillus* sp. sebagai antimikroba dalam menghambat mikroorganisme akan berkaitan dengan siklus pertumbuhan sel yang dilalui dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder (Yulianti dkk., 2024). Penelitian ini kontrol positif menggunakan antibiotik *Ciprofloxacin* 1%. Hal ini karena *Ciprofloxacin* merupakan sebuah antibiotik spektrum luas yang tergolong fluorokuinolon paling umum yang bekerja dengan mengganggu aktivitas DNA girase (Faidiban dkk., 2020).

KESIMPULAN

1. Ditemukan 12 isolat bakteri *Bacillus* sp. pada rhizosfer rumput paitan dari 5 titik lokasi yang berbeda di kawasan hutan De Djawatan Banyuwangi.
2. *Bacillus* sp.2 memiliki daya hambat paling tinggi yaitu sebesar 11,92 mm dengan kategori kuat. *Bacillus* sp.1 memiliki daya hambat paling kecil yaitu sebesar 7,25 mm dengan kategori sedang, serta *Bacillus* sp.5, 6, 8, 9, 10, 11, dan 12 tidak memiliki daya hambat.

DAFTAR PUSTAKA

Cahya, K. D., Kawuri, R., dan Wijana, I. M. S. (2022). Potensi *Bacillus* sp. sebagai Agen Antagonis terhadap *Athelia rolfsii* Penyebab Busuk Pangkal Batang Kedelai (*Glycine max* L.). *Metamorfosa*, 9(2), 325-337. <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2022.v09.i02.p12>

- Davis, W. W. and Stout, T. R. (1971). Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. *American Society for Microbiology*, 22(4), 650-665. [10.1128/am.22.4.659-665.1971](https://doi.org/10.1128/am.22.4.659-665.1971)
- Faidiban, A. N., Posangi, J., Wowor, P. M., dan Bara, R. A. (2020). Uji Efek Antibakteri *Chromodoris annae* terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Medical Scope Journal*, 1(2), 67-70. <https://doi.org/10.35790/msj.v1i2.27847>
- Fitria, A. N. dan Zulaika, E. (2018). Aklimatisasi pH dan Pola Pertumbuhan *Bacillus cereus* S1 pada Medium MSM Modifikasi. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 7(2), 39-41. [10.12962/j23373520.v7i2.36788](https://doi.org/10.12962/j23373520.v7i2.36788)
- Flori, F., Mukarlina., dan Rahmawati. (2020). Potensi Antagonis Isolat *Bacillus* spp. asal Rizosfer Tanaman Lada (*Piper nigrum* L.) sebagai Agen Pengendali Jamur *Fusarium* sp. JDF. *BIOMA: Jurnal Biologi Makassar*. 5(1): 111-120. <https://doi.org/10.20956/bioma.v5i1.9923>
- Hadimani, B. and Kulkarni, S. (2017). Ideal Growth Conditions for Mass Production of Biocontrol Agent *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn. *Plant Archives*, 17(1), 535-538. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/https://doi.org/10.5555/20183312019>
- Handayani, K., Royanti, V., dan Ekowati, C. N. (2023). Indeks Keanekaragaman Bakteri *Bacillus* sp. dari Tanah Kebun Raya Liwa. *Gunung Djati Conference Series*. 18: 46-52. conferences.uinsgd.ac.id/index.php/gdcs/article/view/1097/718
- Harir, M., Bendif, H., Bellahcene, M., Fortas, Z., and Pogni, R. (2018). *Streptomyces Secondary Metabolites Basic Biology and Applications of Actinobacteria*. IntechOpen. London.
- Kabir, M. S., Hsieh, Y. H., Simpson, S., Kerdahi, K., and Sulaiman, I. M. (2017). Evaluation of Two Standard and Two Chromogenic Selective Media for Optimal Growth and Enumeration of Isolates of 16 Unique *Bacillus* Species. *Journal of Food Protection*, 80(6), 952-962. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-441>
- Karimela, E. H., Ijong, F. G., dan Dien, H. A. (2017). Karakteristik *Staphylococcus aureus* yang Diisolasi dari Ikan Asap Pinekuhe Hasil Olahan Tradisional Kabupaten Sangihe. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(1): 188-198. journal.ipb.ac.id/index.php/jphpi
- Karunia, E., Kurniatuhadi, R., dan Yanti, A. H. (2021). Karakterisasi Bakteri *Bacillus* sp. (Kode NrLtF5) yang Diisolasi dari Usus Cacing Nipah (*Namalycastis rhodochorde*). *Jurnal Protobiont*. 10(3): 69-73. <https://doi.org/10.26418/protobiont.v10i3.55574>
- Leboffe, M. J. and Pierce, B. E. (2012). *Brief Microbiology. Laboratory Theory and Application* 2nd Edition. Morton Publishing. Englewood.
- Mardiah. (2017). Uji Resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap Antibiotik Amoxicillin, Tetracyclin, dan Propolis. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*. 8(16): 1-6. <https://doi.org/10.70561/jal.v8i2.2978>
- Napitupulu, H. G., Rumengan, I. F. M., Wullur, S., Ginting, E. L., Rimper, J. R. T. S. L., dan Toloh, B. H. (2019). *Bacillus* sp. sebagai Agensi Pengurai dalam Pemeliharaan *Brachionus rotundiformis* yang Menggunakan Ikan Mentah sebagai Sumber Nutrisi. *Jurnal Ilmiah Platax*. 7(1): 158-169. <https://doi.org/10.35800/jip.7.1.2019.22627>
- Nurhidayati, S., Faturrahman., dan Ghazali, M. (2015). Deteksi Bakteri Patogen yang Berasosiasi dengan *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Bergejala Penyakit Ice-Ice. *Jurnal Sains Teknologi dan Lingkungan*, 1(2), 24-30. [10.29303/jstl.v1i2.53](https://doi.org/10.29303/jstl.v1i2.53)
- Nurmiati, N., Putra, W. D., Periadnadi, P. (2024). Potential and Optimization of Antibiotic Production Isolate Bacteria Antibiosis *Bacillus* sp. Origin of Salt Liquid Waste of Anchovy (*Stolephorus* sp.) Against Bacteria Test. *Jurnal Biologi Tropis*. 24(3): 385-395. [10.29303/jbt.v24i3.7403](https://doi.org/10.29303/jbt.v24i3.7403)
- Putra, R., Ismed, F., dan Handayani, D. (2017). Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri dari Fraksi Etil Asetat Bakteri *Bacillus* sp.3 (A1) yang Bersimbiosis dengan Spon Laut *Haliclona fascigera*. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*, 4(2), 24-29. [10.29208/jsfk.2017.4.1.146](https://doi.org/10.29208/jsfk.2017.4.1.146)

- Rahman., Hardi, I., Baharuddin, A. (2018). Identifikasi Bakteri *Staphylococcus* sp. pada *Handphone* dan Analisis Praktik *Personal Hygiene*. *Window of Health*. 1(1): 40-49. [10.13140/RG.2.2.27779.32801](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27779.32801)
- Rianti, E. D. D., Tania, P. O. A., dan Listyawati, A. F. (2022). Kuat Medan Listrik AC dalam Menghambat Pertumbuhan Koloni *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *BIOMA : Jurnal Ilmiah Biologi*. 11(1): 79-88. <https://journal.upgris.ac.id/index.php/bioma/article/view/9561/5301>
- Sa'adah, F. L., Rahmadhini, N., dan Suharto. (2023). Eksplorasi dan Identifikasi *Bacillus* sp. dari Tanah Rizosfer Bambu dan Tomat di Kelurahan Made, Sambikerep, Surabaya. *Agrocentrum*. 1(1): 1-6. <https://doi.org/10.33005/agrocentrum.v1i1.7>
- Sari, D. R. (2015). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Tanah yang Terdapat di Sekitar Perakaran Tanaman. *Bio-site*. 1(1): 21-27. <https://mail.online-journal.unja.ac.id>
- Setiadi, A., Pritanto, A. A., Alhumaira, B. S. F., Khasanah, S. N. (2023). Konservasi Keanekaragaman Hayati Endemik melalui *Ecology, Socio-Economic, dan Socio-Cultural Approach* (Studi pada Taman Kehati Kokolomboi, Sulawesi Tengah). *Learning Society: Jurnal CSR, Pendidikan, dan Pemberdayaan Masyarakat*. 4(1): 244-254. [10.30872/ls.v4i1.2313](https://doi.org/10.30872/ls.v4i1.2313)
- Sulistyoningtyas, M. E., Roviq, M., dan Wardiyati, T. (2017). Pengaruh Pemberian PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) pada Pertumbuhan *Bud Chip Tebu (Saccharum officinarum L.)*. *Jurnal Produksi Tanaman*, 5(3), 396-403. <https://protan.studentjournal.ub.ac.id/index.php/protan/article/view/392/387>
- Tang, M., Li, L., Wang, X., You, J., Li, J., and Chen, X. (2020). Elevational is the Main Factor Controlling the Soil Microbial Community Structure in Alpine Tundra of the Changbai Mountain. *Scientific Reports*. 10(12442): 1-15. [10.1038/s41598-020-69441-w](https://doi.org/10.1038/s41598-020-69441-w)
- Yulianti, N. M. A., Indraningrat, A. A. G., dan Widhidewi, N. W. (2024). Skrining Aktivitas Antibakteri *Bacillus* sp. PCAR1 dari Rumpun Laut *Eucheuma spinosum* terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Aesculapius Medical Journal*, 4(2), 165-171. [10.22225/amj.4.2.2024.165-171](https://doi.org/10.22225/amj.4.2.2024.165-171)
- Yunus, F., Lambui, O., dan Suwastika, I. N. (2017). Kelimpahan Mikroorganisme Tanah pada Sistem Perkebunan Kakao (*Theobroma cacao L.*) Semi Intensif dan Non Intensif. *Natural Science : Journal of Science and Technology*. 6(3): 194-205. <https://garuda.kemdiktisaintek.go.id/documents/detail/1324715>