

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PATOGEN
Escherichia Coli DAN *Salmonella Sp.* PADA KOTORAN KELELAWAR DI
GUA PONGANGAN, GRESIK DAN GUDANG TALUN BOJONEGORO,
JAWA TIMUR**

Aminollah, Bambang Irawan, Agus Supriyanto
Program Studi Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga, Surabaya
Email: aminollahmimink@gmail.com

Abstract

This study aims to isolation and identify pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* on bats guano samples. As much of 6 samples taken from the bats guano Pongangan Caves and Talun Warehouse in Bojonegoro, East Java. The bat guano samples yielded 12 isolates were grown on selective media EMB (*eosin methylene blue*) and SSA (*Salmonella-Shigella agar*) with the *pour plate method*. Samples are conventionally identified through observation of morphological characters colonies grown in selective media, and further identified microscopically Gram staining and followed by biochemical tests using test IMViC. IMViC test consists of indole test, *methyl red* (MR), *voge's-Proskauer* (VP), *sulphide indole motility* (SIM), *simmons citrate* (SC) and sugar fermentation test, H₂S and glucose test TSIA. The results of 12 isolates isolation of pathogenic bacteria from fecal samples bat on selective EMB medium, showed positive results with the character *Echerichia coli* with to bacteria colonies circularly, typical metallic green colored, Gram-negative rods and able to ferment lactose. Meanwhile, other pathogenic bacterial isolates were found *Salmonella sp.* with the character of colonies on SSA medium, round black core or not, sunny transparent. does not produce indole compounds, but produces glucose, citric and H₂S toxic compound. It can be concluded that the samples were taken from the bat droppings Pongangan Caves and Talun Warehouse Bojonegoro, East Java, there is a pathogenic bacterium *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* which can cause infections in humans or animals with each character isolates were almost identical and there was no significant difference.

Keywords: Pathogens, bats guano, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*

Pendahuluan

Kotoran Kelelawar atau yang sering disebut *bat guano*, keberadaannya ternyata menyimpan potensi besar untuk dimanfaatkan sebagai pupuk organik. Seiring berkembangnya pertanian alami pada akhir-akhir ini menyebabkan guano

yang berasal dari kotoran kelelawar menjadi salah satu alternatif pengganti pupuk buatan atau kimia (anorganik) (Suwarno & Idris, 2007). Guano dipilih sebagai pupuk alternatif karena kandungan unsur haranya yang cukup lengkap, beberapa unsur hara penyusun guano antara lain nitrogen (N), fosfat (P), kalium (K), kalsium (Ca), dan sulfur (S) sangat dibutuhkan sebagai penyubur tanah sehingga banyak masyarakat disektor pertanian membutuhkannya (Suwahyono, 2011).

Di Indonesia banyak daerah yang menjadi sumber tambang guano diantaranya adalah beberapa gua yang ada di Sumatera, Jawa, Madura, dan Papua. Guano sendiri telah diekspor ke beberapa negara seperti Jepang, Singapura dan Amerika (Lingga & Marsono, 2013). Di Jawa Timur sendiri kotoran Kelelawar bisa didapatkan di Gua Pongangan Gresik, dan bekas Gudang Gula Talun, Bojonegoro. Pada kedua tempat tersebut, terdapat aktivitas masyarakat dalam penambangan guano yang dilakukan secara perorangan maupun kelompok. Akan tetapi, dalam proses penambangannya dilakukan secara konvensional dengan alat-alat yang sederhana dan tidak terlalu memperdulikan aspek kesehatan dan keselamatan kerjanya.

Bakteri yang umumnya digunakan sebagai indikator pencemaran feses adalah *Escherichia coli* (Purnawijayanti, 2001). Sehingga, kontak fisik secara langsung dengan kotoran Kelelawar menimbulkan kekhawatiran dari aspek biologis dan tingkat higienitas lingkungannya. Guano sendiri pada dasarnya adalah kotoran hewan yang didalamnya sangat memungkinkan terdapat beberapa mikroorganisme termasuk bakteri patogen seperti koliform dan kelompok bakteri enterik yang menempati saluran pencernaan hewan. Mikroba patogen yang diuji berdasarkan standar mutu pupuk organik yang berasal dari kotoran hewan pada persyaratan teknis minimal pupuk organik padat adalah mikroba kontaminan seperti *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.* (Suswono, 2011).

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini disusun untuk mengidentifikasi keberadaan bakteri patogen dari kelompok bakteri koliform

fekal *Escherichia coli* dan bakteri enterik seperti *Salmonella sp.* pada kotoran kelelawar dengan menggunakan teknik isolasi dan identifikasi bakteri.

Metode Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya. Pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Februari hingga Mei 2016. Pengambilan sampel kotoran kelelawar di Gua Pongangan Gresik dan bekas Gudang Gula Talun, Bojonegoro, Jawa Timur.

Bahan Penelitian

Bahan-bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel kotoran kelelawar (*bat guano*), media pertumbuhan bakteri yang terdiri dari: media selektif EMB (*Eosin methylen blue*) (Merk) dan SSA (*Salmonella-Shigella agar*) (Oxoid), dan beberapa media uji fisiologis yaitu media uji IMVic (indol, methyl red, voges-proskauer dan citrat) (Oxoid), SIM (*sulfide indol motility*) (Oxoid) dan media uji TSIA (*triple sugar iron agar*) (Merk), pewarna Gram (kristal violet, lugol, alkohol, dan safranin).

Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain , plastik sampel , Pot urine K-50, spatula spoon, Autoclave (OSK 6500, ALP Co. Ltd), shaker (GFL), timbangan analitik (Shimadzu), timbangan digital, botol sampel (250 ml dan 500 ml), labu Erlenmeyer (Herma dan Duran), cawan Petri, tabung reaksi (Pyrex), Bunsen, jarum ose, pipet ukur (Pyrex), kapas, gelas ukur (Pyrex), Mikroskop cahaya (Olympus), gelas objek dan penutupnya.

Prosedur Penelitian

Prosedur Penelitian ini antara lain, menggunakan 6 sampel kotoran kelelawar (*bat guano*) yang berasal dari 2 Gua di Pogangan Gresik dan bekas

Gudang Gula di Talun, Bojonegoro Jawa Timur. Sampel diambil di 2 titik berbeda, dengan 2 kali ulangan yaitu di dalam gua dan di mulut gua bagian luar. Sampel yang diambil pada setiap titik pengambilan sebanyak 250 gram. 2) pembuatan media selektif EMB dan SSA, serta media uji biokimia IMViC dan TSIA. Isolasi *Salmonella sp.* dan *Escherichia coli* dengan menggunakan uji mikrobiologi yang berdasarkan pada metode analisis uji bakteri enteropatogenik (Fardiaz, 1993). Sampel yang di ambil dimasukkan ke dalam botol steril pada suhu 5°C. Sebanyak 25 gram sampel yang telah dikoleksi dilakukan pengenceran menggunakan 250 ml Aquades steril pada botol sampel, kemudian diambil 1 ml secara *pour plate* ke media selektif EMB dan SSA. 4) Identifikasi menggunakan pewarna gram dan diamati di mikroskop cahaya 5) dan tahapan akhir, isolat di karakterisasi menggunakan uji IMVic.

Analisa Data

Data yang diperoleh, dianalisa secara kualitatif melalui pengamatan makroskopis dan mikroskopis koloni, serta karakter biokimianya menggunakan buku pedoman *Atlas Photographic Microbiology of Laboratory* (Alexander, 2001), dan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holtj.G.,et.al, 1994).

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian ini, bakteri dari sampel kotoran kelelawar yang berhasil ditumbuhkan pada media selektif EMB (*eosin methylen blue*) dan *Salmonella-Shigella agar* (SSA), masing-masing didapatkan 6 isolat. Isolat yang tumbuh didominasi oleh isolat yang berasal dari lokasi sampel bagian dalam. Adapun data hasil yang diperoleh dalam penelitian ini bisa dilihat pada tabel 4.1 di bawah ini:

Tabel 4.1 Hasil isolasi bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.*

Lokasi Pengambilan Sampel	Kode Isolat	Ulangan	Titik Sampling	
			Dalam	Luar
Gua Pongangan 1 Gresik	GP1E	1	+	-
		2	+	-
	GP1S	1	+	-
		2	+	+
Gua Pongangan 2 Gresik	GP2E	1	-	-
		2	+	+
	GP2S	1	-	-
		2	+	+
Gudang Gula Talun , Bojonegoro	GBE	1	+	-
		2	+	-
	GBS	1	-	-
		2	+	-

(+) = Positif, (-) = Negatif

Keterangan :

GP1E, GP2E, GBE = isolat *Escherichia coli*

GP1S, GP2S, GBS = isolat *Salmonella sp.*

Isolat yang tumbuh pada media selektif adalah bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.* memiliki karakter morfologi koloni pada tabel (4.1.2 dan 4.2.2) di bawah ini:

Tabel. 4.1.2 Karakter morfologi bakteri *Escherichia coli* di media EMB.

Kode Isolat	Titik sampel	Morfologi Koloni			
		Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna
GP1E	Dalam	Bulat	Rata	Cembung	Hijau metalik
	Luar	Bulat	Rata	Cembung	Hijau metalik
GP2E	Dalam	Bulat	Rata	Cembung dan Halus	Hijau metalik
	Luar	Bulat	Rata	Cembung dan Halus	Hijau metalik
GBE	Dalam	Bulat	Rata	Cembung dan Halus	Hijau metalik
	Luar	Tidak beraturan	Rata	Cembung	Abu-abu

Tabel. 4.2.2 Karakter morfologi bakteri *Salmonella sp.* di media SSA.

Kode Isolat	Titik sampel	Morfologi Koloni			
		Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna
GP1E	Dalam Luar	Bulat Bulat	Rata Rata	Cembung Cembung	Cerah transparan dan hitam Cerah transparan, inti hitam ditengah
GP2E	Dalam Luar	Bulat Bulat	Rata Rata	Cembung dan Halus Cembung dan Halus	Cerah transparan dan hitam Cerah transparandan, inti hitam ditengah
GBE	Dalam Luar	Bulat Bulat dan Tidak beraturan	Rata Rata	Cembung dan Halus Cembung dan halus	Cerah transparan hingga buram dan inti hitam Hitam

Bakteri dari isolat *Escherechia coli* dan *Salmonella sp.* yang telah dimurnikan pada media NA (*nutrient agar*) miring, kemudian diwarnai dengan pewarnaan Gram dan diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 μm . Hasil pewarnan Gram dapat dilihat pada tabel (4.3.1) di bawah ini:

Tabel. 4.3.1 Hasil uji pewarnaan Gram dari isolat *Escherechia coli* dan *Salmonella sp.*

Kode Isolat	Titik Sampling		Bentuk Sel
	Dalam	Luar	
GP1E	Negatif	Negatif	Batang
GP1S	Negatif	Negatif	Batang
GP2E	Negatif	Negatif	Batang
GP2S	Negatif	Negatif	Batang
GBE	Negatif	Negatif	Ovoid
GBS	Negatif	Positif	Batang

Bakteri dari famili Enterobacteriaceae termasuk *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.* seringkali dibedakan karakter fisiologisnya dengan menggunakan uji Imvic (indol, motilitas, MR-VP, dan sitrat) dan beberapa uji fermentasi glukosa, H₂S dan gas (Jawetz dkk, 1996). Berikut hasil uji Imvic pada kedua

isolat bakteri patogen dari sampel kotoran kelelawar dapat dilihat pada (tabel 4.3.1 dan 4.3.2.) di bawah ini:

Tabel. 4.3.1 Hasil Uji Imvic bakteri dari isolat GP1E, GP2, dan GBE.

Karakteristik	Jenis Isolat		
	GP1E	GP2E	GBE
Uji Gram	Negatif	Negatif	Negatif
Morfologi sel	Batang	Batang	Batang
Motilitas	+	+	-
TSIA	(A/A)	(A/A)	(A/A)
Indol	+	+	+
MR	+	+	+
VP	-	-	-
Sitrat	-	-	-
Hasil Identifikasi	<i>Escherechia coli</i>	<i>Echerechia coli</i>	<i>Echerechia coli</i>

(+) = Positif, (-) = Negatif, K = Alkalis, A =Asam

Tabel. 4.3.2 Hasil Uji Imvic bakteri dari jenis isolat GP1S, GP2S, dan GBS.

Karakteristik	Jenis Isolat		
	GP1S	GP2S	GBS
Uji Gram	Negatif	Negatif	Negatif
Morfologi sel	Batang	Batang	Batang
Motilitas	+	+	+
TSIA	+	+	+
Indole	(K/A/ H ₂ S)	(K/A/H ₂ S)	(K/A/H ₂ S)
MR	+	+	+
VP	-	-	-
Citrat	+	+	+
Hasil Identifikasi	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Salmonella sp</i>

(+) = Positif, (-) = Negatif, K = Alkalis, A =Asam

Hasil pemeriksaan pada 6 sampel kotoran kelelawar yang diambil dari 3 lokasi, membuktikan adanya bakteri patogen dari kelompok koliform fekal yaitu *Escherichia coli* dan kelompok enterik seperti *Salmonella sp.* melalui pengamatan langsung terhadap 12 isolat yang berhasil ditumbuhkan. Isolat yang telah didapatkan diidentifikasi secara mikroskopis menggunakan pewarnaan gram, dan dikarakterisasi dengan uji biokimia. Dari hasil pemeriksaan yang dilakukan, secara keseluruhan menunjukkan pertumbuhan koloni isolat bakteri *Escherechia coli* dan *Salmonella sp.* rata-rata menunjukkan hasil positif di titik sampling bagian

dalam pada ketiga lokasi pengambilan sampel kotoran kelelawar. Sebagian besar bakteri cenderung tumbuh dalam suasana gelap meskipun faktor ini bukan suatu keharusan dikarenakan sinar ultraviolet atau radiasi matahari dapat membunuh jasad renik (Arisman, 2008). *Escherichia coli* membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata berwarna hijau metalik (Jawetz dkk, 1996). Pada media selektif yang diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C ciri koloni tak berwarna sampai merah muda, bening sampai buram dan ada bintik hitam ditengah (Paul & Janet, 2008).

Dari hasil isolasi kedua bakteri baik *Escherechia coli* dan *Salmonella sp.* termasuk gram negatif. Hal ini, ditunjukkan dengan bakteri berbentuk batang warna merah pada preparat isolat bakteri sampel kotoran kelelawar yang telah berhasil dimurnikan. Dinding sel bakteri Gram negatif mengandung lebih sedikit lapisan *peptidoglikan*. Tetapi di luar lapisan tersebut, terdapat struktur membran yang tersusun atas protein yaitu *fosfolipida* dan *lipopolisakarida* (LPS). Komponen *lipopolisakarida* dinding sel bakteri Gram negatif ini sangat penting dalam menentukan toksisitas bakteri pada inang atau *host*-nya (Volks & Wheeler, 1984).

Bakteri memiliki berbagai aktifitas biokimia untuk melakukan pertumbuhan dan memperbanyak dengan menggunakan *raw material* (nutrisi) yang diperoleh dari lingkungan sekitarnya. Umumnya bakteri memperoleh energi dengan melakukan aktifitas biokimia dari lingkungannya melalui jalur fermentasi. Untuk membedakan *Escherichia coli* dalam aktifitas biokimianya dengan bakteri koliform lain dapat menggunakan uji IMViC (indol, merah metil, voge's prouskauer, sitrat) (Fardiaz, 1993). Berdasarkan hasil uji IMViC *Escherichia coli* mampu memfermentasikan laktosa pada media TSIA dan tidak menghasilkan sitrat sebagai sumber karbon. Sedangkan *Salmonella sp.* tidak mampu memfermentasikan laktosa melainkan hanya glukosa saja, namun menghasilkan senyawa racun berupa H₂S yang berwarna hitam pada media SSA. Kedua bakteri mampu mempertahankan produk akhir berupa asam stabil yang ditunjukkan dengan hasil positif pada media MR dan tidak menghasilkan asetil metil karbinol (*Asetoin*) pada media VP. Kedua bakteri patogen ini, juga memiliki kemampuan bermotilitas ditandai dengan menyebarnya koloni pada media SIM (semisolid).

Escherichia coli merupakan salah satu anggota famili Enterobacteriaceae yang menimbulkan penyakit diare, karena strain dari bakteri ini menghasilkan enterotoksin yang mampu merusak mukosa usus (Jawetz. dkk, 1996). Infeksi *Salmonella sp.* di alam liar sering akibat transmisi dari hewan sekitar atau manusia yang tidak sengaja menjadi penyebab paparan (Rahmi dkk, 2001). Adapun pencegahan infeksi bakteri dapat dilakukan dengan metode fisik, dan metode kimia, metode fisik dengan menggunakan sterilisasi panas matahari atau pengeringan, pembakaran, filtrasi dan radiasi sinar ultraviolet. Sedangkan, metode kimia menggunakan bahan-bahan kimia seperti dari senyawa alkohol, benzaldehid dan formalin (Sridhar, 2008).

Kesimpulan

Pada kotoran kelelawar yang diambil di Gua Pongangan, Gresik dan Gudang Gula Talun, Bojonegoro, Jawa Timur, telah ditemukan bakteri patogen dari kelompok koliform fekal yaitu *Escherichia coli* dan kelompok enterik lainnya, seperti *Salmonella sp.* yang dapat menimbulkan beberapa penyakit infeksi dan berbahaya bagi manusia maupun hewan. Karakter masing-masing kedua isolat bakteri patogen yang ditemukan pada kotoran kelelawar di tempat pengambilan sampel hampir sama dan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Saran

Berdasarkan peraturan menteri pertanian tahun 2006, bahwa setiap pupuk organik yang berasal dari kotoran hewan harus memenuhi standar mutu minimal pupuk organik yaitu bebas dari mikroba patogen untuk melindungi konsumen dan produsen yang akan mengedarkannya. dan Untuk menjadikan kotoran kelelawar sebagai pupuk organik, harus bebas dari mikroba patogen dengan cara melakukan sterilisasi melalui metode fisik seperti pengeringan, filtrasi dan penyinaran sinar UV terhadap kotoran tersebut.

Daftar Pustaka

- Apriantono, A., 2006. Peraturan Menteri Pertanian Nomor 02/Pert/Hk.060/2/2006 Tentang Pupuk Organik dan Pembenh Tanah. Kementan RI. Jakarta
- Arisman, 2008. *Keracunan Makanan: Buku Ilmu Gizi*. EGC Kedokteran. Jakarta
- Fardiaz, S., 1993. *Analisi Mikrobiologi Pangan*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Holtj.G.,et.al., 1994. *Bergeys Manual Determinative Bacteriology*.8th ed. Baltimore: Williamn and Wilkins, Philadelphia.
- Jawetz, E.M., Melnick,. & Adelbergh, 1996. *Mikrobiologi kedokteran*. Edisi 20. Diterjemahkan oleh dr. Edi Nugroho dan dr.Rf Maulani, Jakarta; EGC Press.
- Lingga & Marsono, 2013. *Petunjuk Penggunaan Pupuk*. Penebar Swadaya. Jakarta
- Paul, E., & Janet, D., 2008. *Laboratory Diagnosis Of Infectious Diseases*. Woulters-Lippicott Williams & Whilkins. Philadelphia
- Purnawijayanti, H., 2001. *Sanitasi, Higiene, dan Keselamatan Kerja dalam Pengelolaan Makanan*. Kanisius. Yogyakarta
- Rahmi, E., Agustina, D., & Jamin, F., 2011. *Jurnal Isolasi dan Identifikasi Genus Salmonella dan Shigella Dari Fesse Irangutan Sumatera (Pongo abili)*. Fakultas Kedokteran Hewan Uinsyiah
- Suwahyono, U., 2011. *Penggunaan Pupuk Secara Efektif dan Efisien*. Niaga Swadaya. Jakarta
- Suwarno & Idris, K., 2007. *Jurnal Tanah dan Lingkungan*, Vol. 9 No.1,37-43*Potensi Dan Kemungkinan Penggunaan Guano Secara Langsung Sebagai Pupuk Di Indonesia*. Departemen Ilmu Tanah dan Sumberdaya Lahan, Faperta, IPB, Bogor.
- Suswono, 2011.Peraturan Menteri Pertanian No/70/Permentan/SR.140/10/2011. *Tentang Pupuk Organik, Pupuk Hayati Dan Pembenh Tanah*.Jakarta
- Sridhar, 2008. *Sterilization and Disenfectan*. www.microrao.com/commentnote, diakses pada 2 juli 2016, Pukul 19:00 WIB
- Volks & Wheeler., 1984. *Basic Microbiology*. Harper & Row, Publisher, Inc., California.