

Identifikasi Bakteri Penghasil Antibiotik dari Mikrohabitat Ekstrim di Ekosistem Mangrove Secara Molekuler dan Aktivitasnya Terhadap Bakteri Patogen (*Vibrio Alginolyticus*)

(Identification of Antibiotic-Producing Bacteria from Extreme Microhabitat in Molecular Mangrove Ecosystems and Their Activity on Pathogenic Bacteria (*Vibrio alginolyticus*))

^{1*)} Desy Mutia Sari, ²⁾ Irwan Effendi, ³⁾ Nursyirwani

¹⁾ Mahasiswa Pascasarjana, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Riau, Kampus Bina Widya Km 12,5. Panam Pekanbaru – Riau 28293, Indonesia

²⁾ Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Riau

³⁾ Ilmu Kelautan, Mikrobiologi dan Bioteknologi, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Riau, Pekanbaru, Riau, Indonesia

^{*)} Korespondensi: desy_mutiasari@ymail.com

Diterima : 15 Oktober 2019 / Disetujui : 5 November 2019

ABSTRAK

Kemampuan bakteri penghasil antibiotik dari mikrohabitat di ekosistem mangrove dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan antibiotik baru untuk keperluan industri maupun konservasi lingkungan. Ekosistem mangrove di Dumai memiliki potensi sebagai bakteri penghasil antibiotik yang belum banyak diteliti. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh bakteri penghasil antibiotik dari mikrohabitat ekstrim di ekosistem mangrove dalam menekan pertumbuhan bakteri patogen (*Vibrio alginolyticus*). Sampel diambil dari beberapa mikrohabitat kawasan mangrove di Dumai (Kelurahan Purnama Dumai), Provinsi Riau. Metode survei digunakan untuk identifikasi, uji antibakteri terhadap bakteri patogen (*Vibrio alginolyticus*). Isolasi bakteri dilakukan dengan menggunakan metode cawan tuang (*pour plate*) dan purifikasi dilakukan dengan menggunakan metode gores (*streak* kuadran). Identifikasi dilakukan melalui pengamatan morfologi makroskopis, mikroskopis, uji biokimia, uji antagonisme (metode difusi agar pada media *Nutrient* agar) dan analisis DNA. Hasil sekuensing 16S rDNA dari isolat bakteri penghasil antibiotik terbaik yang diidentifikasi secara molekuler terdiri dari bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter hormaechei*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Enterococcus gallinarum*. Bakteri penghasil antibiotik yang ditemukan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *V. alginolyticus*.

Kata kunci : bakteri penghasil antibiotik, bakteri patogen, identifikasi, mikrohabitat ekstrim

ABSTRACT

The presence of antibiotic-producing bacteria from microhabitat in mangrove ecosystems can be useful to produce new antibiotics for industrial and environmental conservation. Mangrove ecosystems in Dumai have the potential to possess antibiotic-producing bacteria that have not been much studied. The objective of this research was to obtain antibiotic-producing bacteria from extreme microhabitats in the mangrove ecosystem in

suppressing the growth of pathogenic bacterial pathogens (Vibrio alginolyticus). Samples were taken from several microhabitat mangrove areas in Dumai (Kelurahan Purnama Dumai), Riau Province. The survey method is used for identification, antibacterial test against pathogenic bacteria (V. alginolyticus). Bacterial isolation was carried out using the pour plate method and purification was carried out using the quadrant streak method. Identification is carried out through observations of macroscopic, microscopic morphology, biochemical tests, antagonism tests (agar diffusion method on agar nutrient media) and DNA analysis. Sequencing of 16S rDNA from the best antibiotic-producing bacterial isolates indicated that molecularly identified of Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus cereus, Enterobacter hormaechei, Klebsiella pneumonia, and Enterococcus gallinarum. All bacteria were able to inhibit the growth of V. alginolyticus.

Keywords : *antibiotic producing bacteria, pathogenic bacteria, identification, extreme microhabitat*

PENDAHULUAN

Penggunaan antibiotik dilakukan karena adanya permasalahan terhadap daya tahan tubuh dan penyakit dari udang budidaya. Antibiotik digunakan untuk pengobatan dan pencegahan penyakit di bidang perikanan. Secara lebih luas antibiotik digunakan sebagai kontrol infeksi maupun suplemen makanan untuk meningkatkan pertumbuhan dan hasil produksi ikan. Pada saat ini banyak obat antimikroba baru yang telah dikembangkan yang mampu menyembuhkan hampir semua infeksi antimikroba (Tjay dan Rahardja, 2010). Namun seiring berjalannya waktu, satu demi satu bakteri mulai resisten terhadap pemberian antibiotik. Pada saat ini banyak ilmuwan yang berhasil mengembangkan antibiotik baru, tetapi sudah semakin banyak bakteri yang resisten terhadap antibiotik (Borong, 2012).

Mikrohabitat di ekosistem mangrove di kawasan Dumai Provinsi Riau berupa bagian dalam komuditas mangrove (jenis *Acanthus ilicafilis*, *Nipah* sp, *Rhizophora apiculata*, *Xylocarpus granatum*), ikan tembakul (*Periophthalmus modestus*), kepiting uka (*Uca* sp), semut (*Oecophylla* sp), semut hitam (*Dolichoderus* sp), kerang (*Geloina Erosa*) dan Siput bakau (*Cerithidea djadjariensis*) pada kawasan mangrove di Dumai). Mikrohabitat diekosistem mangrove di Dumai memiliki potensi sebagai bakteri penghasil antibiotik baru yang belum banyak diteliti untuk keperluan industri maupun konservasi lingkungan, kesehatan maupun perikanan. Penyediaan sumber antibiotik baru bagi masyarakat pesisir juga merupakan salah satu alternatif pemecahan masalah ekonomi masyarakat pesisir. Keberadaan mikroorganisme pada ekosistem mangrove sangat erat kaitannya dengan kestabilan ekosistem. Hutan mangrove memiliki keragaman mikroba yang signifikan, yang memainkan peran penting dalam berbagai proses dan aplikasi lingkungan (Auta *et al.*, 2017).

Kemampuan bakteri penghasil antibiotik dari mikrohabitat ekstrim di ekosistem mangrove yang diperoleh dapat bermanfaat untuk menghasilkan antibiotik baru. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh bakteri penghasil antibiotik dari mikrohabitat ekstrim diekosistem mangrove dalam menekan pertumbuhan bakteri patogen patogen (*Vibrio alginolyticus*). Bakteri patogen *Vibrio alginolyticus* dapat menyebabkan penyakit pada ikan budidaya sehingga perlu diantisipasi untuk pencegahannya. Untuk mengatasi masalah tersebut telah banyak dilakukan penelitian untuk mencegah bakteri patogen menginfeksi ikan

yang dibudidayakan yaitu dengan menggunakan senyawa antimikroba (Feliatra, *et al.*, 2012).

Menurut Utami, (2011) Resistensi mikroorganisme terhadap antibiotik dapat terjadi karena beberapa hal, antara lain: (1) Adanya mikroorganisme yang menghasilkan enzim yang dapat merusak aktivitas obat. (2) Terjadinya perubahan kondisi permeabilitas dari mikroorganisme. (3) Terjadinya perubahan kondisi permeabilitas dari mikroorganisme Adanya modifikasi reseptor site pada bakteri sehingga menyebabkan afinitas obat berkurang. (4) Terjadi mutasi dan transfer genetik.

Ekosistem mangrove di Dumai memiliki kawasan yang sangat luas dan sangat berpotensi akan senyawa bioaktif yang dapat dijadikan sebagai antimikroba dan tentunya potensi bakteri penghasil antibiotik di daerah tersebut akan cenderung lebih besar di dibandingkan dengan daerah lainnya. Oleh karena itu, peneliti tertarik meneliti Identifikasi Bakteri Penghasil Antibiotik dari Mikrohabitat Ekstrem di Ekosistem Mangrove Secara Molekuler dan Aktivitasnya terhadap Bakteri Patogen (*V. alginolyticus*).

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan Mei sampai Agustus 2019. Identifikasi Bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Laut Jurusan Ilmu Kelautan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau. Identifikasi DNA bakteri dan proses PCR dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Riau. Identifikasi DNA bakteri dan proses PCR dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Riau. Selanjutnya proses purifikasi dan sekuensing dilakukan oleh pihak *First Base Malaysia* yang dikirim oleh PT. Genetika Science Indonesia, Jakarta Barat.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah Erlenmeyer, Gelas ukur, Timbangan analitik, Tabung reaksi, Cawan petri, Jarum ose, Lampu Bunsen, *Autoclave*, Mikropipet, Inkubator, Mikroskop binokuler, Sentrifus, *Vortex mixer*, *Waterbath*, Mikropipet, Mikro tip, *Tube*, GD column, UV spektrofotometer, UV *transiluminator*, *Thermal cycler (PCR)*, Elektroforesis, *Sisir well comb*, dan kamera digital.

Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel berupa mangrove (jenis *Acanthus ilicifilis*, *Nipah* sp, *Rhizophora apiculata*, *Xylocarpus granatum*), ikan tembakul (*Periophthalmus modestus*), kepiting uka (*Uca* sp), semut (*Oecophylla* sp), semut hitam (*Dolichoderus* sp), kerang (*Geloina Erosa*) dan Siput bakau (*Cerithidea djadjariensis*) pada ekosistem mangrove di kawasan Dumai dan Siak Provinsi Riau. Bahan yang digunakan pada penelitian adalah bakteri patogen (*V.alginolyticus*), media *Nutrient agar* (NA), larutan fisiologis, larutan pewarnaan Gram (Crystal Violet, aquades, larutan Iodine, Etil Alkohol 95%, dan larutan Safranin), larutan hidrogen peroksida (H₂O₂ 3%, media SIM (*Sulfide-Indol-Motility*), media MR-VP dan indikator metil merah, media *Simmon's Citrate Agar*, media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), media *Tryptone Soy Broth* (TSB), alkohol 70%, *reagen kovacks*, W1 Buffer, Gel DNA Binding (GB Buffer), Wash buffer, Elution buffer, Etanol absolut, Master Mix (10x buffer PCR, 2 μ m dNTP,

Taq, dH₂O, DNA, 10 μ m primer), 1 set primer: 24F: 5' – AGA GTT TGA TCC TGG CT – 3' 1541R: 5' – AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA – 3', gel agarose, larutan Tris Acetate (TAE), Marker, dan *Loading Dye*.

Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode survey dengan mengisolasi bakteri dari beberapa microhabitat kawasan mangrove di Dumai. Metode survei digunakan untuk identifikasi, uji antibakteri terhadap bakteri patogen (*Vibrio alginolyticus*) dan analisis DNA. Isolasi bakteri dilakukan dengan menggunakan metode cawan tuang (*pour plate*) dan purifikasi dilakukan dengan menggunakan metode gores (*streak* kuadran). Identifikasi dilakukan melalui pengamatan morfologi makroskopis (warna, bentuk, tepi dan elevasi koloni) dan mikroskopis (dengan melakukan pewarnaan Gram, uji motilitas, uji oksidase, uji indol, uji katalase, uji sitrat, uji gula, uji aktivitas terhadap bakteri patogen dan analisis DNA). Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel dan gambar dan dibahas secara deskriptif, didukung dengan studi literatur dan hasil-hasil penelitian terdahulu sebagai pembandingan

Prosedur Penelitian

Pengambilan dan penanganan sampel

Sampel diperoleh dari kawasan ekosistem mangrove di Dumai Provinsi Riau berupa mangrove (jenis *Acanthus ilicifilis*, *Nipah* sp, *Rhizophora apiculata*, *Xylocarpus granatum*), ikan tembakul (*Periophthalmus modestus*), kepiting uka (*Uca* sp), semut (*Oecophylla* sp), semut hitam (*Dolichoderus* sp), kerang (*Geloina Erosa*) dan Siput bakau (*Cerithidea djadjariensis*) pada kawasan mangrove di Dumai. Sampel yang sudah diambil dimasukkan ke dalam plastik sampel dan dibawa ke laboratorium untuk dianalisis.

Prosedur penelitian

Sebanyak 1 gr sampel yang diperoleh diisolasi pada media *Nutrient Agar* (NA) dan dilakukan proses pengenceran (NaCl fisiologis). Koloni yang tumbuh diamati secara makroskopis (pengamatan morfologi warna, bentuk, tepi dan elevasi koloni) dan mikroskopis (pewarnaan gram dan pengamatan bentuk sel bakteri) pada media NA. Identifikasi bakteri dilakukan secara fisiologis dan biokimiawi berupa uji katalase, uji sulfida (H₂S), uji penggunaan gula, uji motilitas, uji citrat, dan uji metil merah. Uji aktivitas terhadap bakteri patogen (*Vibrio alginolyticus*) dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar pada media *Nutrient agar* (NA). Adanya zona bening pada kertas cakram menunjukkan hasil sensitivitas positif dan tidak ada nya zona bening pada kertas cakram menunjukkan tidak ada sensitivitas negatif.

Isolat bakteri penghasil antibiotik potensial dilakukan uji molekuler menggunakan Metode Sekuens 16s rRNA. Ekstraksi DNA menggunakan kolom mini DNA. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan PCR dengan primer 24F dan 1541R sebanyak 1 μ l. Hasil PCR dianalisis pada gel agarosa 1,5% dalam Tris-acetat-EDTA (TAE). Proses elektroforesis dilakukan selama \pm 40menit pada sekitar 60 mA (100-120 v) dibaca oleh UV Transilluminator. Purifikasi (pencucian) DNA hasil PCR dari gel agarose dilakukan dengan menggunakan Geneaid® *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit*. Hasil sekuensing dari isolat bakteri dianalisis dengan sistem BLAST. Hasil analisis

hubungan kekerabatan isolat bakteri dengan pohon filogenetik menggunakan metode *Maximum Parsimony* dan *Neighbor* Bergabung dengan 1000 kali *bootamp booting*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Penghasil Antibiotik

Beberapa sampel bakteri penghasil antibiotik dari mikrohabitat di ekosistem mangrove Dumai (Desa Purnama) diisolasi pada media NA. Sampel berupa mangrove (jenis *Acanthus ilicafilis*, *Nipah* sp, *Rhizophora apiculata*, *Xylocarpus granatum*), ikan tembakul, kepiting uka, semut, semut hitam, dan Siput bakau. Sejumlah 410 isolat bakteri yang diperoleh dilakukan diuji penapisan dengan isolat bakteri patogen (*Vibrio alginolyticus*). Hasil isolasi bakteri pada media *Nutrient agar* ditemukan sebanyak 31 isolat bakteri terbaik dengan bentuk, warna, tepian, elevasi dan ukuran yang berbeda.

Penapisan dalam mikrobiologi adalah sejenis tes yang bertujuan untuk mengidentifikasi adanya mikroorganisme tertentu (misalnya bakteri) dalam sejumlah besar spesimen. Uji penapisan ini relatif mudah karena peralatan yang dibutuhkan tidak terlalu mahal dan dalam pengerjaan pun tidak terlalu rumit. Akan tetapi, pada uji ini sangat diperlukan ketelitian khusus dan perlakuan yang harus selalu steril karena setiap pengujian yang berhubungan dengan bakteri dipengaruhi oleh banyak faktor salah satunya kontaminan. Beberapa tes penapisan masih dapat dilanjutkan dengan tes lain yang lebih spesifik (Singleton, 2001). Hasil Penelitian pada pengamatan morfologi isolat bakteri memiliki bentuk, ukuran, elevasi, tepian, dan warna yang berbeda. Wijayanto *et al.* (2015) dan Adithya *et al.* (2017) menemukan, bakteri memiliki bentuk koloni bundar dan menyebar, serta berwarna putih.

Hasil penelitian Krismawati *et al.*, (2015) Berdasarkan hasil uji pendahuluan potensi isolat sebagai penghasil antibiotik, didapatkan 16 isolat terseleksi yang dapat menghambat bakteri uji. Terdapat 10 isolat yang menunjukkan kemampuan menghambat pada grup A, sedangkan pada grup B sebanyak 5 isolat dan dari grup C sebanyak 1 isolat. Selanjutnya ke 16 isolat tersebut diuji kembali pada bakteri uji yang sama dengan pengulangan sebanyak tiga kali. Menurut Romero *et al.* (2012) budidaya ikan intensif telah menyebabkan munculnya beberapa penyakit bakteri, yang telah menyebabkan peningkatan penggunaan antibiotik. Pada dasarnya penggunaan obat-obatan ini ditujukan untuk pengobatan penyakit dan meningkatkan status kesehatan ikan dan meningkatkan kualitas lingkungan.

Hasil uji pewarnan Gram dalam penelitian ini didapatkan 27 isolat bakteri bersifat Gram positif dan 4 isolat bakteri bersifat Gram negatif. Hasil uji katalase pada penelitian menunjukkan 27 isolat bakteri bersifat katalase positif dan 4 isolat bakteri bersifat katalase negatif. Hasil uji indol pada penelitian ini menunjukkan 4 isolat bakteri bersifat indol positif dan 27 isolat bakteri bersifat indol negatif.

Hasil pada uji citrat pada penelitian menunjukkan bahwa 18 isolat bakteri bersifat citrat positif dan 13 isolat bakteri bersifat citrat negatif. Hasil uji motilitas menunjukkan bahwa 8 isolat bersifat inmotil dan 23 isolat bersifat motil. Hasil uji sulfida menunjukkan 3 isolat bakteri mampu menghasilkan sulfida dan 28 isolat bakteri tidak mampu menghasilkan sulfida. Hasil pada uji penggunaan gula menunjukkan 25 isolat bakteri mampu memfermentasi glukosa, laktosa dan sukrosa sedangkan 6 isolat bakteri tidak mampu memfermentasi laktosa dan sukrosa tetapi mampu memfermentasi glukosa. Hasil pengamatan morfologi bakteri penghasil antibiotik dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pengamatan morfologi bakteri penghasil antibiotik.

Isolat	Bentuk Koloni	Warna	Tepian	Elevasi	Ukuran
A.1 ₃	Bulat	Putih Susu	Licin	Datar	Sedang
B.5 ₁	Bulat	Putih Susu	Licin	Timbul	Kecil
C.2 ₁	Tidak Beraturan	Putih Susu	Berombak	Timbul	Kecil
C.2 ₂	Bulat	Putih Susu	Licin	Datar	Kecil
C.5 ₁	Tidak Beraturan	Putih Susu	Tak Beraturan	Datar	Kecil
D.1 ₁	Bulat	Putih Kekuningan	Berombak	Datar	Kecil
D.3 ₁	Bulat	Putih Kekuningan	Licin	Datar	Kecil
D.5 ₁	Tidak Beraturan	Putih Susu	Tak Beraturan	Datar	Kecil
E.2 ₂	Bulat	Putih Susu	Licin	Timbul	Kecil
E.2 ₃	Bulat	Kuning	Licin	Timbul	Kecil
F.1 ₃	Bulat	Putih Susu	Licin	Datar	Kecil
F.1 ₃	Bulat	Putih Susu	Tidak Beraturan	Datar	Kecil
G.1 ₂	Bulat	Putih Susu	Licin	Timbul	Sedang
G.2 ₂	Bulat	Putih Susu	Licin	Timbul	Kecil
G.2 ₂	Bulat	Putih Susu	Licin	Datar	Kecil
H.1 ₁	Bulat	Putih Susu	Licin	Datar	Sedang
I.2 ₀	Rizoid	Putih Kekuningan	Tidak Beraturan	Berbukit	Sedang
I.4 ₀	Kompleks	Putih Kekuningan	Berlekuk	Berbukit	Sedang
I.5 ₀	Konsentris	PutihKekuningan	Licin	Datar	Sedang
J.8 ₀	Bulat	PutihKekuningan	Licin	Datar	Kecil
J.7 ₀	Tidak Beraturan	Putih Susu	Berombak	Datar	Kecil
J.5 ₀	Bulat	Putih Susu	Tidak Beraturan	Datar	Kecil
K.3 ₀	Bulat	Putih Susu	Licin	Seperti kawah	Kecil
K.2 ₀	Tidak Beraturan	Putih	Berlekuk	Datar	Kecil
K.4 ₀	Bentuk L	Putih	Berombak	Timbul	Kecil
K.4 ₀	Bentuk L	Putih	Berombak	Timbul	Kecil
L.1 ₀	Kompleks	Putih kekuningan	Berlekuk	Datar	Kecil
L.4 ₀	Kompleks	Putih susu	Licin	Berbukit	Kecil
L.9 ₀	Tidak Beraturan	Putih	Tidak Beraturan	Berbukit	Kecil
M.7 ₀	Bulat	Putih	Berombak	Timbul	Kecil
M.6 ₀	Bentuk L	Putih Susu	Licin	Seperti kawah	Sedang
M.5 ₀	Tidak Beraturan	Putih kekuningan	Tidak Beraturan	Datar	Kecil

Hasil penelitian berdasarkan uji biokimia menunjukkan 31 isolat bakteri memiliki karakteristik yang berbeda-beda. Hasil uji biokimia isolat bakteri dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji biokimia bakteri penghasil antibiotik

Isolat	Uji Biokimia						Uji Penggunaan Gula		
	Gram	Katalase	Motilitas	Indol	H ₂ S	Citrat	Glukosa	Laktosa	Sukrosa
A.1 ₃	+	+	-	-	-	+	+	+	+
B.5 ₁	+	+	+	-	-	-	+	+	+
C.2 ₁	+	+	+	-	-	-	+	+	+
C.2 ₂	+	+	+	-	-	-	+	+	+
C.5 ₁	+	+	+	-	-	-	+	+	+
D.1 ₁	+	+	+	-	-	-	+	+	+
D.3 ₁	+	+	+	-	-	-	+	+	+
D.5 ₁	+	+	+	-	-	-	+	+	+
E.2 ₂	+	+	+	-	-	+	+	+	+
E.2 ₃	+	+	+	-	-	+	+	+	+
F.1 ₃	+	+	+	-	-	-	+	+	+
F.1 ₃	+	+	-	-	-	+	+	+	+
G.1 ₂	+	+	+	-	-	+	+	+	+
G.2 ₂	+	+	-	-	-	+	+	+	+
G.2 ₂	+	+	+	-	-	+	+	+	+
H.1 ₁	+	+	+	-	-	-	+	+	+
I.2 ₀	+	-	-	+	-	+	+	-	-
I.4 ₀	+	+	-	+	-	+	+	-	-
I.5 ₀	+	+	+	-	-	-	+	+	+
J.8 ₀	+	+	+	+	-	-	+	-	-
J.7 ₀	+	+	+	-	+	+	+	-	-
J.5 ₀	+	+	+	-	-	+	+	+	+
K.3 ₀	+	+	-	-	-	-	+	+	+
K.2 ₀	-	+	-	-	-	+	+	+	+
K.4 ₀	-	-	+	-	-	+	+	-	-
L.1 ₀	+	+	+	-	-	-	+	+	+
L.4 ₀	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L.4 ₀	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L.9 ₀	+	-	+	-	-	+	+	+	+
M.7 ₀	-	+	+	-	+	+	+	+	+
M.6 ₀	+	-	+	-	-	+	+	+	+
M.5 ₀	-	+	+	+	-	+	+	+	+

Keterangan :

Isolat A : *Acanthus ilicafilius*

Isolat B : *Nypa fruticans*

Isolat C : *Rhyzopora apiculata*

Isolat D : *Xylocarpus granatum*

Isolat E : Kerang

Isolat F : Ikan Tembakul

Isolat G : Kepiting

Isolat H : Semut

Isolat I : Kepiting

Isolat J : Kepiting

Isolat K : Siput

Isolat L : Ikan Tembakul

Isolat M : Ikan Tembakul

+ : Uji Positif

- : Uji Negatif

Hasil penelitian Wijayanto *et al.* (2014) menunjukkan bahwa 27 isolat bakteri bersifat Gram positif dan 4 isolat bakteri bersifat Gram negatif. Adanya

gelembung gas pada uji katalase membuktikan bahwa bakteri bersifat katalase positif. Gram positif adalah bakteri yang dinding selnya menyerap warna violet dan memiliki membran plasma tunggal yang dikelilingi lapisan peptidoglikan yang tebal, kandungan lipidnya rendah, menghambat warna basa dengan kebutuhan nutrient kompleks. Hasil penelitian Holderman *et al.* (2017) berdasarkan hasil pengamatan diketahui bahwa isolat A, C, dan D merupakan bakteri Gram positif coccus, isolat B, E, F, G, H, I, J merupakan bakteri Gram positif basil.

Aktivitasnya Bakteri Penghasil Antibiotik terhadap Bakteri *V. alginolyticus*

Aktivitas bakteri penghasil antibiotik terhadap bakteri patogen dapat dilihat dari zona bening yang terbentuk disekeliling kertas cakram yang diletakkan pada permukaan media NA yang berisi bakteri patogen menunjukkan zona hambatan pertumbuhan bakteri. Pengukuran zona bening pada uji sensitivitas bakteri dilakukan sebanyak 3 kali pengukuran dan hasil dari pengukuran sensitivitas dirata-ratakan. Hasil uji aktivitas bakteri terhadap bakteri pathogen (*V. alginolyticus*) dapat dilihat pada Tabel 3.

Hasil penelitian menunjukkan nilai rata-rata daya hambat isolat bakteri penghasil antibiotik terhadap bakteri *V. alginolyticus* berkisar antara 1,0 mm sampai 7,5 mm. Isolat G.2₂ memiliki nilai daya hambat tinggi terhadap bakteri *V. alginolyticus* dan isolat C.5₁ memiliki nilai daya hambat rendah terhadap bakteri *V. alginolyticus*. Isolat G.2₂ memiliki respon hambat yang tergolong sedang dengan nilai rata-rata sebesar 7,5 mm dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*. Klasifikasi Respon Hambat Bakteri menurut Rita (2010) jika diameter zona bening berukuran <5 mm memiliki respon hambat tergolong lemah. Diameter zona bening berukuran 5-10 mm memiliki respon hambat tergolong sedang. Diameter zona bening berukuran 10-19 mm memiliki respon hambat tergolong kuat. Diameter zona bening berukuran >20 mm memiliki respon hambat tergolong sangat kuat.

Terbentuknya zona bening dikarenakan adanya penghambatan senyawa antimikroba terhadap sel-sel mikroba. Mekanisme kerja dari suatu senyawa antimikroba dapat dilakukan dengan cara mengganggu atau merusak penyusun dinding sel, bereaksi dengan membran sel yang menyebabkan peningkatan permeabilitas seluler, inaktivasi enzim-enzim esensial dan destruksi atau inaktivasi fungsi dan materi genetik (Sari *et al.* 2013).

Diameter hambat tidak selalu naik sebanding dengan naiknya konsentrasi antibakteri. Hal ini terjadi karena adanya perbedaan kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media agar, jenis dan konsentrasi senyawa antibakteri dari metabolik sekunder yang dihasilkan. Secara umum kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri disebabkan faktor; produksi antibiotik, bakteriosin, siderophores, lisosom, protease dan hidrogen peroksida atau mempengaruhi pH media dengan menghasilkan asam organik tertentu (Elifah, 2010).

Noaman *et al.* (2014), menjelaskan bahwa beberapa faktor yang dapat mempengaruhi besar kecilnya aktivitas penghambatan zat antibakteri antara lain: 1) jenis, umur dari bakteri penghasil bakteriosin dan bakteri uji; 2) konsentrasi zat antimikroba dan jumlah inokulum atau kepadatan bakteri uji; 3) resistensi dari bakteri terhadap substansi zat antimikroba terkait dengan perbedaan dinding sel

dari bakteri uji; dan 4) kadar substansi aktif atau gugus fungsi dari substansisenyawa antimikroba.

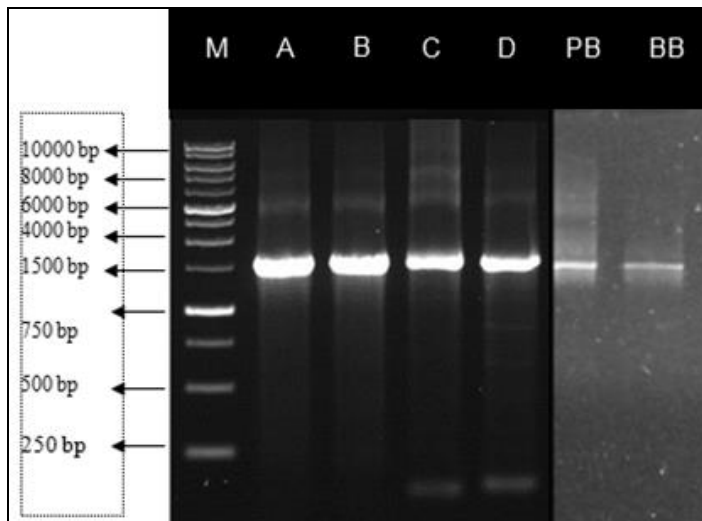
Tabel 3. Aktivitas bakteri terhadap bakteri patogen

Isolat	<i>V. alginolyticus</i>	
	(+)	R (mm) ± SD
A.1 ₃	2,2	2,0 ± 0,3
B.5 ₁	2,5	4,7 ± 1,4
C.2 ₁	2,3	1,3 ± 0,,5
C.2 ₂	1,5	2,0 ± 0,3
C.5 ₁	1,8	1,0 ± 0,5
D.1 ₁	2,0	2,2 ± 0,5
D.3 ₁	2,7	2,3 ± 0,5
D.5 ₁	1,5	2,6 ± 2,0
E.2 ₂	2,8	2,3 ± 0,5
E.2 ₃	1,4	2,3 ± 0,6
F.1 ₃	2,5	2,4 ± 0,9
F.1 ₃	1,6	2,0 ± 1,1
G.1 ₂	1,5	1,3 ± 0,5
G.2 ₂	1,3	7,5 ± 4,5
G.2 ₂	2,3	2,4 ± 0,9
H.1 ₁	2,3	4,3 ± 0,5
I.2 ₀	2,5	2,0 ± 1,1
I.4 ₀	2,8	2,4 ± 0,9
I.5 ₀	1,6	2,3 ± 0,6
J.8 ₀	1,7	2,0 ± 0,3
J.7 ₀	1,4	1,3 ± 0,5
J.5 ₀	1,8	2,4 ± 0,9
K.3 ₀	2,1	2,3 ± 0,5
K.2 ₀	2,5	2,0 ± 1,1
K.4 ₀	2,3	2,0 ± 0,3
L.1 ₀	1,4	2,4 ± 0,9
L.4 ₀	1,6	2,3 ± 0,6
L.9 ₀	1,8	1,3 ± 0,5
M.7 ₀	2,1	4,6 ± 0,5
M.6 ₀	2,4	2,4 ± 0,9
M.5 ₀	1,7	2,6 ± 1,1

Nguyen *et al.* (2014) dan Sahoo *et al.* (2014) menjelaskan bahwa senyawa antibakteri yang dihasilkan dari perairan umumnya memiliki sifat penghambatan spektrum sempit yang artinya kemampuan penghambatan hanya terjadi pada tingkat kekerabatan yang dekat dengan bakteri penghasil antibakteri sendiri dan beberapa senyawa antibakteri dari golongan Gram positif perairan memiliki aktivitas penghambatan spektrum luas dan dapat digunakan untuk mengatasi patogen pada budidaya perikanan.

Identifikasi Bakteri Penghasil Secara Molekuler

Hasil ekstraksi DNA total yang dielektroforesis dengan 1 % *Gel Agarose* menunjukkan DNA total dari bakteri penghasil antibiotik yang berpotensi menghambat pertumbuhan bakteri patogen telah berhasil didapat melalui proses isolasi DNA, Lisis sel, DNA *binding* dan pencucian. Hasil sampel DNA yang sudah diamplifikasi yang dielektroforesis dengan 1 % gel agarose dari 6 isolat bakteri (Gambar 1). Berdasarkan Gambar 1 menunjukkan besarnya produk PCR yang menghasilkan pita tunggal adalah mendekati 1500 bp (*base pair*) sesuai dengan perbandingan menggunakan marker DNA. Besarnya ukuran ini sesuai dengan ukuran yang diharapkan dari gen-gen 16S rDNA bakteri yaitu 1500-1600 bp. Sekuensing DNA 6 isolat Bakteri menggunakan primer 24F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CT-3' dan 1541R: 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'. Bentuk dari hasil sekuensing dari masing-masing isolat dalam bentuk elektroforegram dengan siklus yang terpisah (*forward* dan *reverse*). Pasangan basa (bp) yang diperoleh setelah digabung antara fasta *forward* dan *reverse* dengan program *seqmen* pada DN Astar dengan total panjang untuk isolat bakteri B.5₁, D.5₁, H.1₁, G.2₂, M.7₀, M..5₀.



Gambar 1. Produk PCR yang di Elektroforesis pada 1 % *Gel Agarose* (Keterangan: M (Fragmen marker DNA 1 kb ladder); A (Bakteri B.5₁); C (Bakteri H.1₁); D (Bakteri G.2₂); PB (Bakteri M.7₀); BB (Bakteri M.5₀))

Hasil sekuen masing-masing isolat bakteri dengan sistem BLAST dapat dilihat bahwa jenis bakteri yang berhasil ditelusuri dengan sistem BLAST yaitu bakteri *B. amyloliquefaciens* dengan tingkat homologi 99%, 2 bakteri *B. cereus* dengan tingkat homologi 100 %, bakteri *E. hormaechei* dengan tingkat homologi 97 %, bakteri *K. pneumoniae* dengan tingkat homologi 99 % dan bakteri *E. gallinarum* dengan tingkat homologi 99 %. Isolat B.5₁, D.5₁ dan M.7₀ merupakan isolat yang memiliki genus yang sama tetapi berbeda spesies, sedangkan isolat B.5₁ dan M.7₀ merupakan isolat bakteri yang memiliki spesies sama. Isolat H.1₁, G.2₂ dan M.5₀ merupakan isolat bakteri yang memiliki genus yang berbeda dan berbeda spesies.

Skринing bakteri menggunakan teknik sekuens 16S rDNA merupakan suatu teknik modern dalam mengidentifikasi suatu spesies organisme. Teknik ini

dilakukan dengan menganalisa struktur atau susunan basa DNA yang terdapat di daerah 16S rDNA. Amplifikasi gen 16S rDNA dapat menentukan spesies bakteri dalam ekologi bakteri secara metagenom (Vetrovsky and Baldrian, 2013).

Isolat yang mempunyai persamaan sekuen 16S rDNA lebih dari 97% dapat mewakili pada tingkat spesies yang sama. Persamaan sekuen 16S rDNA antara 93-97% dapat mewakili identitas pada tingkat genus tetapi berbeda pada tingkat spesies. Sedangkan jika dibawah 93% kemungkinan spesies baru yang urutan basa nitrogennya belum masuk dalam data base gen bank (Hagstrom dalam Lusiano, 2007).

B. amyloliquefacien merupakan salah satu bakteri yang dapat menghasilkan amilase. Alpha amilase dapat disolasi dari bakteri *B. amyloliquefaciens* yang mempunyai berat molekul kira-kira 50 kDa. *B. amyloliquefaciens* merupakan bakteri yang termasuk dalam golongan spesies *Bacillus*. *B. amyloliquefaciens* banyak dikenal karena memiliki sifat katabolik dan kemampuannya dalam mendegradasi makromolekul yang kompleks (Gangadharan *et al*, 2006). Bakteri ini mempunyai sifat yang termofilik (tahan terhadap suhu yang tinggi).

Susana (2017), bakteri *B. cereus* mampu menghasilkan senyawa antimikroba dan dapat menghambat bakteri patogen yaitu *V. alginolyticus*, *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. yang ditandai dengan terbentuknya zonabening pada saat uji antagonis. Kemampuan ini diduga karena bakteri dari jenis ini menghasilkansenyawa antibiotik. Senyawa ini merupakan kumpulan zat-zat kimia yang diproduksi oleh mikroorganisme diantaranya oleh fungi dan bakteri yang memiliki fungsi menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme lain. Bakteri *B. cereus* digunakan sebagai probiotik pada budidaya perikanan yang diambil dari saluran pencernaan karena bakterii ini memiliki zat antimikroba yaitu bakteriosin (Umoro, 2016).

Kebanyakan bakteri dengan genus *Enterobacter* memiliki hasil positif untuk pemeriksaan sitrat, motil, dan memproduksi gas dari glukosa namun banyak dari bakteri ini juga memiliki hasil negatif pada uji H₂S. Organisme ini diketahui dapat mengakibatkan infeksi nosokomial, seperti pneumonia, infeksi pada luka, infeksi saluran kemih, dan infeksi yang diperantarai alat (Brooks *et al.*, 2010), oleh karena itu, penggunaan bakteri ini sebagai penghasil enzim untuk keperluan proses produksi gelatinase perlu untuk dipertimbangkan.

Enterobacter hormaechi dan *Klebsiella pneumonia* bisa digunakan sebagai antibiotik. Namun penelitian ini cukup menarik, karena berdasarkan literatur yang dibaca bahwa isolat yang ditemukan merupakan bakteri patogen yang menyerang manusia. Akan tetapi tidak mustahil bahwa bakteri patogen ini memiliki sistem pertahanan diri yang dimiliki oleh bakteri secara umum, dengan memproduksi metabolit yang ada pada bakteri itu sendiri. Dengan cara mengekstraksi seluler sebagai hasil metabolit sekunder yang dapat menghambat bakteri patogen lainnya.

Spesies *Enterococcus gallinarum* ini diketahui menyebabkan kelompok infeksi, meskipun dianggap sangat langka (Fluit *et al.* 2001). Menurut Gilmore dan Clewell (2002) *Enterococcus gallinarum* adalah satu-satunya spesies enterococcal yang diketahui selain *E. faecium* dan *E. faecalis* yang diketahui menyebabkan wabah dan menyebar di rumah sakit (Bennett *et al.* 2014).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa mikrohabitat ekstrim dari ekosistem mangrove dapat menghasilkan enam bakteri penghasil antibiotik terbaik yaitu bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter hormaechei*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Enterococcus gallinarum*. Bakteri penghasil antibiotik yang ditemukan dapat menghambat bakteri patogen (*V. alginolyticus*) pada ikan. Sebaiknya dilakukan penelitian lanjut tentang identifikasi senyawa penyusun metabolit primer dan sekunder serta optimalisasi pertumbuhan metabolit primer dan sekunder yang dituju.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari Penelitian Guru Besar Universitas Riau TA 2018. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Riau atas dukungan dana penelitian ini sehingga telah selesai dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Adithiya DS, Feliatra F, Afrizal T. 2017. Using of Bacteria Heterotrophic as an Anti-Bacterial Againsts Pathogenic Bacteria Isolated from Sea Water in Dumai City, Riau Province. *Jurnal Online Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau* 4(2) : 1-17.
- Auta HS, Emenike CU, Fauziah SH. 2017. Screening of *Bacillus* Strains Isolated from Mangrove Ecosystems in Peninsular Malaysia for Microplastic Degradation. *Jurnal Environmental Pollution* 231: 1552 (Abstr.). *Environmental Pollution* : DOI 10.1016/j.envpol.2017.09.043.
- Bennett LR, Budi W, Auky H, Adnyana IBP, Mulyoto P. 2012. Indonesian infertility patients' health seeking behaviour and patterns of access to biomedical infertility care: an interviewer administered survey conducted in three clinics. *Jurnal Reproductive Health* 9(24): 1-7 <http://www.reproductive-health-journal.com/content/9/1/24>.
- Borong, MF. 2012. Kerasionalan Penggunaan Antibiotik Pada Pasien Rawat Inap Anak Rumah Sakit M.M Dunda Limboto Tahun 2011. [Skripsi]. Gorontalo: Program Studi D-III Farmasi Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan dan Keolahragaan Universitas Negeri Gorontalo.
- Brooks GT, Butel JS, Morse SA, Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2004. *Medical Microbiology 23rd edition*. Mc Graw Hill Companies Inc.
- Elifah. E. 2010. Uji Antibakteri Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Senggani (*Melastoma candidum*, D. Don) Terhadap *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* Serta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya. [Skripsi]. Surakarta: UNS.
- Feliatra F, Fitria Y, Nursyirwani N. 2012. Antagonis bakteri probiotik yang diisolasi dari usus dan lambung ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) terhadap bakteri patogen. *Jurnal Perikanan dan Kelautan* 17(1): 16 – 25.

- Fluit ADC, Visser MR, Schmitz FJ. 2001. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 14(4):836-71.
- Gangadharan D, Sivaramakrishnan S, Nampoothiri KM, Pandey A. 2006. Solid Culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for Alpha Amylase Production. *Jurnal Biotechnol* 44(2): 269–274.
- Gilmore MS, Coburn PS, Nallapareddy SR, Murray BE. 2002. Enterococcal Virulence. In M. S. Gilmore, D. B. Clewell, P. Courvalin, G.M. Dunny, B. E. Murray, and L.B. Rice (Eds). *The Enterococci: Pathogenesis Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. Asm Press. Washington, DC. 301-354. ISBN: 1-55581-234-1
- Hagstrom, Pinhassi AJF, Zweiefel UL. 2000. Biogeographical Marine Diversity Among Bacterioplankton. *Aquatic Microbial Technology* 21: 231-244.
- Holderman MV, Queljoe ED, Rondonuwu SB. 2017. Identifikasi Bakteri Pada Pegangan Eskalator di Salah Satu Pusat Perbelanjaan di Kota Manado. *Jurnal Ilmiah Sains* 17(1): 1-6.
- Krismawati H, Sembiring L, Wahyuono S. 2015. *Streptomyces* Penghasil Antibiotik yang Berasosiasi dengan rhizosfer beberapa Spesies Mangrove. *Jurnal PLASMA* 1(2): 59-70.
- Nguyen DV, Pham T, Nguyen TH, Nguyen TT. 2014. Screening of Marine Bacteria with Bacteriocin like Activities and Probiotic Potential for Ornate Spiny Lobster (*Panulirus ornatus*) Juveniles. *Journal Fish Shell Immun* 40(1) : 49-60.
- Noaman NH, Fattah A, Khaleata M, Zaky SH. 2004. Factor Affecting Antimicrobial Activity of *Synechococcus leopoliensis*. *Journal Microbiol Research* 159(4): 395-402.
- Rola AC, Narvaez TA, Naguit MRA, Elazegui DD, Brillo BBC, Paunlagui MM, Jalotjot HC, Cervantes CP. 2018. Impact of the closed fishing season policy for sardines in Zamboanga Peninsula, Philippines. *Marine Policy* (87): 40–50. DOI: 10.1016/j.marpol.2017.09.029.
- Romanengko LA, Naoto T, Masataka U, Natalia IK, Valery VM. 2008. Diversity and antagonistic activity of sea ice bacteria isolated from the Sea of Japan. *Microbiol Environ* 2(3): 209-214.
- Romero J, Feijoó CG, Navarrete P. 2012. *Antibiotics in aquaculture – use, Abuse and Alternatives*. Chile: Universidad de Chile, Biotechnology Laboratory (INTA) Sara Savic. 43 hlm.
- Sahoo TK, Jena PK, Patel AK, Seshadri S. 2014. Bacteriocin and their Application for The Treatment of Bacterial Diseases in Aquaculture: *Journal Aquacult Research* 47(4): 1013-1027.
- Sari YNM. 2013. Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi DNA Bakteri Asam Laktat (BAL) yang Berpotensi Sebagai Antimikroba dari Fermentasi Markisa Kuning (*Passiflora edulis var. flavicarfa*) [Skripsi]. Padang: Diploma Thesis, Universitas Andalas

- Singleton P dan Sainbury D. 2001. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biologi*, 3rd Edition.
- Susana M. 2017. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Heterotrofik pada Perairan Laut Kawasan Pemukiman dan Perairan Bersalinitas Rendah di Kelurahan Purnama Dumai Provinsi [Skripsi]. Pekanbaru: Universitas Riau.
- The European Commission. 2010. Commission Regulation (EU) No37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union* 15(2377): 1–72. <http://doi.org/2004R0726> - v.7 of 05.06.2013.
- Umoro A. 2016. Isolasi *Bacillus* Sp. Penghasil Bakteriosin dan Peningkatan Aktivitasnya sebagai Penghambat *Vibrio harveyi* [Tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Utami ER. 2011. Antibiotika, resistensi, dan rasionalitas terapi. *Jurnal SAINSTIS* 1(1): 191–198.
- Utami RA. 2011. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Alkaloid Ageratum conyzoides L Terhadap Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus Secara in Vitro*. [Skripsi]. Bandung: Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA UPI Bandung
- Vazquez DE, Duarte CM, Agusti S, Jurgen K, Vangue D, Gasol JM. 2008. Microbial plankton abundance and heterotrophic activity across the central Atlantic Ocean. *Journal Progress in Oceanography* 79(1): 83–94.
- Větrovský T, Baldrian P. 2013. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *Journal PloS ONE* 8(2): 1-10.
- Wijayanto N, Feliatra, Nedi S. 2015. Antagonism Test of Probiotics Bacteria Isolated from Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Against Pathogens (*Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp and *Vibrio alginolyticus*). *Jurnal Online Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau* 2(1): 1-8.