

JURNAL METAMORFOSA
Journal of Biological Sciences
ISSN: 2302-5697
<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

Isolasi Bakteri Dari Rumput Laut *Eucheuma spinosum* dan Skrining Aktivitas Antibakteri Terhadap Beberapa Bakteri Gram Positif dan Negatif

*Bacteria associated with seaweeds *Eucheuma spinosum* and antibacterial screening against several Gram positive and negative Bacteria*

I Gusti Agung Ayu Sucitra Ekaryani¹, Anak Agung Gede Indraningrat^{2*}, Ni Made Ayu Suardani Singapurwa³, I Wayan Sudiarta⁴, Anak Agung Made Semariyani⁵, I Putu Candra⁶

¹³⁴⁵⁶Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, Universitas Warmadewa

²Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Warmadewa
Jl. Terompong No.24, Sumerta Kelod, Kec. Denpasar Timur, Kota Denpasar, Bali, Indonesia 80239

*Email: indraningrat@warmadewa.ac.id

INTISARI

Bakteri yang berasosiasi dengan rumput laut memproduksi beragam senyawa aktif salah satunya yang bersifat antibakteri untuk melindungi inangnya dari infeksi bakteri patogen *Eucheuma spinosum* adalah jenis rumput laut yang umum ditemukan di perairan Indonesia, namun potensi antibakteri dari isolat yang berasosiasi dengan rumput laut ini masih belum banyak diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menskrining antibakteri dari isolat yang berasosiasi dengan rumput laut *E. spinosum*. Bakteri dari *E. spinosum* diisolasi dengan metode cawan sebar menggunakan media Zobell Marine Agar (ZMA), Nutrient Agar (NA), Plate Count Agar (PCA), ISP-1, ISP-2 dan Starch M protein agar (SMP). Morfologi isolat bakteri dikelompokkan berdasarkan *colony morphology code*, pewarnaan Gram dan uji katalase. Aktivitas antibakteri isolat diuji menggunakan metode *perpendicular streak* terhadap *Staphylococcus aureus* atcc 25923, *Streptococcus mutans* fnc 0405, *Escherichia coli* atcc 25922, *Klebsiella pneumoniae* atcc 700603. Hasil isolasi bakteri memperoleh 32 isolat dengan sebaran 14 isolat dari media umum (ZMA, NA, dan PCA) dan 18 isolat dari media khusus (ISP-1, ISP-2 dan SMP). Pengamatan terhadap 32 isolat menunjukkan tujuh isolat tergolong Gram positif, 25 Gram negatif, 25 katalase positif dan tujuh katalase negatif. Hasil skrining antibakteri menunjukkan 22 isolat mampu menghambat sekurangnya satu bakteri uji. Isolat PCAR1 dan SMPR9 adalah dua isolat dengan aktivitas antibakteri tertinggi terhadap *S. mutans* sebesar berturut-turut 9,21 mm dan 7,89 mm. Diameter zona hambat yang terbentuk pada isolat PCAR1 dan SMPR9 terhadap bakteri uji lain berkisar < 2.5 mm. Hasil penelitian ini secara umum memberikan gambaran potensi isolat bakteri yang berasosiasi dengan *E. spinosum* sebagai penghasil senyawa antibakteri.

Kata Kunci: Rumput Laut, *Eucheuma spinosum*, Isolasi, Antibakteri

ABSTRACT

Bacteria associated with seaweed produce a variety of active compounds including antibacterial substance which beneficial to protect host against pathogenic bacteria. *Eucheuma spinosum* is a type of seaweed commonly found in Indonesia, however, antibacterial activity of bacteria associated with this seaweed is largely unknown. This study aims to isolate and to screen for antibacterial activity from isolates associated with *E. spinosum* seaweed. Bacterial isolates were cultivated by spread method on

Zobell Marine Agar (ZMA), Nutrient Agar (NA), Plate Count Agar (PCA), ISP-1, ISP-2 and Starch M protein agar (SCA) media. The morphological characteristics were analyzed based on colony morphology code, Gram staining and catalase test. Antibacterial activity was screened using *perpendicular streak* against *Staphylococcus aureus* atcc 25923, *Streptococcus mutans* fnc 0405, *Escherichia coli* atcc 25922, *Klebsiella pneumoniae* atcc 700603. Thirty-two bacterial isolates were obtained in which 14 isolates generated from general media (ZMA, NA, and PCA) and 18 isolates from specific media (ISP-1, ISP-2 and SMP). Of these 32 isolates, seven isolates classified as Gram positive, 25 Gram negative, 25 catalase positive and seven catalases negative. Twenty-two isolates showed antibacterial activity against at least one test bacteria. Isolates PCAR1 and SMPR9 were the two isolates with the highest antibacterial activity against *S. mutans* at 9.21 mm and 7.89 mm, respectively. While, the diameter zone of inhibition of these isolates against other test bacteria were in the range of < 2.5 mm. The study provides an overview of potential of bacterial isolates associated with *E. spinosum* as a producer of antibacterial compounds.

Keyword: Seaweed, *Euचेuma spinosum*, Isolation, Antibacterial

PENDAHULUAN

Rumput laut merupakan makroalga benthic yang hidup melekat pada dasar perairan serta struktur tubuhnya tidak dapat dibedakan antara akar batang dan daun sehingga tergolong sebagai *thallophyta* (Supriyantini *et al.*, 2018). Rumput laut memiliki lebih dari 782 jenis yang tersebar di seluruh Indonesia dan berdasarkan pigmennya jenis tersebut terdiri dari 196 alga hijau, 134 alga cokelat, 452 alga merah (Anggadiredja *et al.*, 2009). Dari beragam jenis rumput laut, rumput laut dari genus *Euचेuma* adalah salah satu anggota kelas *Rhodophyceae* yang banyak dibudidayakan di Indonesia karena memiliki kandungan agar dan karagenan yang tinggi berkisar antara 62-68% dari berat keringnya dibandingkan jenis rumput laut lainnya (Aslan, 1998). *Euचेuma spinosum* merupakan salah satu jenis rumput laut yang banyak dibudidayakan di Bali untuk keperluan industri kosmetik, tekstil dan obat-obatan (Hudha *et al.*, 2012).

Rumput laut *E. spinosum* adalah satu biota laut yang berasosiasi dengan mikroorganisme khususnya bakteri (Hollants *et al.*, 2013). Hal ini karena permukaan rumput laut menyediakan substrat yang cocok bagi habitat bakteri dan menyediakan oksigen serta carbon organik yang berfungsi sebagai nutrisi untuk multiplikasi bakteri (Bolinches, 1988). Sementara itu sebagai timbal balik, bakteri memproduksi senyawa metabolit primer seperti vitamin, enzim, nitrogen terikat ataupun berupa metabolit sekunder seperti antibiotik untuk mendukung

pertumbuhan inangnya (Hollants *et al.*, 2013). Senyawa metabolit sekunder berfungsi untuk membantu inangnya dalam mempertahankan diri dari patogen ataupun bakteri kompetitor yang dapat menyebabkan penyakit (Sieburth, 1968; Ginting *et al.*, 2019).

Sejauh ini penelitian yang mengkaji isolat bakteri yang berasosiasi dengan *E. spinosum* dan potensi antibakteri yang dimiliki masih terbatas (Rahmayanti *et al.*, 2019). Sehingga, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mempelajari morfologi bakteri yang berasosiasi dengan rumput laut *E. spinosum* lokal Bali. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk menskrining aktivitas antibakteri dari isolat bakteri yang berasosiasi dengan rumput laut *E. spinosum*. Skrining antibakteri dari isolat *E. spinosum* difokuskan pada empat jenis bakteri yaitu *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumoniae* yang merupakan jenis bakteri yang umum dilaporkan menjadi agen infeksius pada manusia maupun hewan (Krzyściak *et al.*, 2014., Lozano *et al.*, 2016., Ramos *et al.*, 2021., De Koster *et al.*, 2022.,). Sehingga, isolat yang mampu menghambat salah satu dari bakteri uji ini dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai kandidat penghasil senyawa antibakteri.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel *E. spinosum*

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai September 2021 Laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Warmadewa. Sampel *E. spinosum* diambil dari pantai di Desa Patas Singaraja, Kecamatan Gerokgak, Kabupaten Buleleng, Provinsi Bali (8.186 LS, 114.813 BT). Sampel diambil secara aseptik menggunakan scalpel steril dan ditampung pada botol Falcon 50 mL steril. Botol berisi sampel disimpan di dalam kotak *styrofoam* untuk selanjutnya dibawa ke Laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Warmadewa. Sampel disimpan pada suhu 4°C sebelum tahapan isolasi bakteri dikerjakan.

Media isolasi bakteri

Pada penelitian ini digunakan tiga jenis media agar yang menargetkan bakteri secara umum yaitu *Zobell Marine Agar* (ZMA, Himedia), *Nutrient agar* (NA, Himedia), *Plate Count Agar* (PCA, Oxoid). Selain itu digunakan pula tiga media khusus untuk menargetkan aktinobakteria yaitu ISP-1 (5.0 gram/L *peptone*, 3.0 gram/L *yeast extract*, 20 gram/L *bacto agar*), ISP-2 (4.0 gram/L *yeast extract*, 10 gram/L *malt extract*, 4 gram/L *dextrose*, 20 gram/L *bacto agar*) dan *Starch M protein agar* (SMP, Himedia).

Pembuatan media pertumbuhan bakteri ditimbang formulasi yang sudah ditentukan. Empat media agar yang tidak mengandung komponen garam yaitu NA, PCA, ISP-1 dan ISP-2 dilarutkan pada larutan *artificial seawater* (33 gram/L) untuk menjaga tekanan osmosis bakteri yang akan diisolasi sehingga menyerupai kondisi air laut (Henson *et al.*, 2016). Sementara itu, setiap media yang menargetkan aktinobakteria (ISP-1, ISP-2 dan *starch M-protein*) disuplementasi dengan *nystatin* dan *nalidixic acid* untuk mencegah pertumbuhan bakteri non-aktinobakteria dan jamur. Semua media agar disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C.

Isolasi bakteri yang berasosiasi dengan *E. spinosum*

Sampel rumput laut dicuci bersih dengan *artificial seawater* steril sebanyak tiga kali. Sepuluh gram *E. spinosum* ditimbang dan dipotong kecil-kecil dengan memastikan seluruh bagian *thallus* termasuk bagian interior dan eksterior tercampur secara merata. Sampel dihomogenkan dengan cara ditumbuk dengan lumpang dan pastel serta ditambahkan *artificial seawater* steril sebanyak 25 mL.

Sampel *E. spinosum* diencerkan secara bertingkat pada 9 mL *artificial seawater* steril (10^{-1} sampai 10^{-6}). Dari pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-5} diambil 1 mL untuk diinokulasi menggunakan *cotton swab* steril pada media pertumbuhan yang telah ditentukan. Setiap cawan petri diinkubasikan pada suhu 28°C. Pengamatan berkala dilakukan dengan setiap 3 hari selama dua minggu untuk mengamati koloni bakteri yang muncul pada setiap media agar.

Identifikasi isolat bakteri

Koloni bakteri dengan morfologi berbeda yang tumbuh pada media agar mengikuti kriteria *colony morphology code* yang berdasarkan karakteristik yang meliputi bentuk, permukaan, warna dan elevasi (Indraningrat *et al.*, 2019). Sebagai contoh, koloni isolat dengan kode 12314 akan diterjemahkan sebagai bakteri yang memiliki morfologi bulat, permukaan yang kasar dan kusam, warna buram dan permukaan berbentuk kawah (Gambar 1). Untuk bakteri non aktinobakteria dimurnikan pada media *Zobell marine agar*, sedangkan untuk kandidat aktinobakteria dimurnikan pada ISP-2 agar. Koloni dengan morfologi berbeda diasumsikan berasal dari jenis yang berbeda dan setiap koloni terpilih yang selanjutnya diwarnai dengan pewarnaan Gram (Beveridge, 2001) dan dilakukan uji katalase (Delvia *et al.*, 2015).

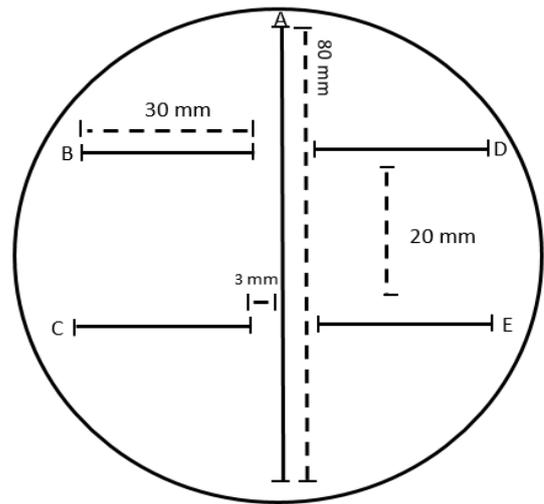
Colony morphology specifications				
Consecutive numbering	FORM	SURFACE	COLOR	ELEVATION
0		no variation		
1		veined	opaque	
2		rough	cloudy	
3		dull	translucent	
4		wrinkled	iridescent	
5		wet		
6				

CMC	1	2 3	1	4	12314
-----	---	-----	---	---	-------

Gambar 1. Skema pemilihan morfologi bakteri berdasarkan metode *colony morphology code* (Indraningrat *et al.*, 2019).

Skrining Aktivitas antibakteri

Bakteri dengan morfologi yang berbeda diskining kemampuan antibakterinya dengan metode *perpendicular streak method* terhadap bakteri uji pada media LB agar (10 gram/L peptone, 5 gram/L yeast extract, 10 gram/L NaCl, 20 gram/L bacto agar) (Ausubel *et al.*, 1994). Isolat bakteri diinkubasikan pada suhu 28°C selama 2x 24 jam hingga koloni terbentuk jelas pada agar. Isolat bakteri diujikan terhadap empat bakteri uji yaitu bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* atcc 25923, *Streptococcus mutans* fnc 0405, dan bakteri Gram negatif *Escherichia coli* atcc 25922 dan *Klebsiella pneumoniae* atcc 700603. Keempat bakteri uji ini di *streak* secara horizontal dengan memberikan jarak 3 mm dari koloni isolat bakteri yang ingin diuji (Gambar 2). *Agar plate* diinkubasikan selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Zona hambat yang terbentuk (dalam mm) dihitung berdasarkan jarak pertumbuhan bakteri oleh isolat bakteri terhadap masing-masing indikator. Sebagai interpretasi semakin jauh jarak tumbuh bakteri indikator dari isolat bakteri indikator dari isolat bakteri yang diuji mengidentifikasi daya yang lebih kuat.



Gambar 2. Skema *Perpendicular Streak Method* ((Velho-Pereira and Kamat, 2011; Indraningrat *et al.*, 2021). A. isolat bakteri uji, B. *Staphylococcus aureus* atcc 25923, C. *Streptococcus mutans* fnc 0405, D. *Escherichia coli* atcc 25922, E. *Klebsiella pneumoniae* atcc 700603

HASIL

Isolasi Bakteri dari *E. spinosum*

Sebanyak 32 bakteri telah diisolasi dari *E. spinosum* yang tersebar pada enam media pertumbuhan berbeda. Koloni yang telah diperoleh kemudian diidentifikasi morfologinya berdasarkan *colony morphology code*, pewarnaan Gram dan uji katalase. Sebaran dari 32 isolat bakteri yang diperoleh terbagi menjadi 14 isolat dari media umum (ZMA, NA, dan PCA) (Tabel 2) dan 18 isolat dari media khusus (ISP-1, ISP-2 dan SMP) (Tabel 3).

Secara umum karakteristik dari 32 isolat yang teramati memiliki morfologi yang cukup bervariasi meliputi bentuk bulat dan tidak beraturan, memiliki permukaan kasar dan kusam dan berlendir, berwarna buram, berawan dan berwarna-warni dan memiliki elevasi yang datar, meninggi, membukit dan berkawah. Hasil pewarnaan Gram pada Tabel 2 dan 3 menunjukkan bahwa isolat dapat dikelompokkan menjaditujuh isolat (22 persen) merupakan Gram positif dan 25 isolat (78 persen). Sedangkan berdasarkan uji katalase, 25 isolat (78 persen) memiliki katalase positif dan tujuh isolat (22 persen) tidak memiliki aktivitas enzim katalase (negatif).

Tabel 2. Morfologi isolat bakteri yang diisolasi pada media ZMA, NA dan PCA

Kode isolat	Morfologi isolat				Pewarnaan Gram	Bentuk Sel	Katalase
	Bentuk	Permukaan	Warna	Elevasi			
ZR1	2 (Tidak Beraturan)	23 (Kasar dan Kusam)	1 (Buram)	3 (Membukit)	negatif	Diplobasil	+
ZR2	1 (Bulat)	3 (Kusam)	1 (Buram)	2 (Meninggi)	negatif	Basil	+
ZR3	1 (Bulat)	23 (Kasar dan Kusam)	1 (Buram)	3 (Membukit)	negatif	Basil	+
ZR4	2 (Tidak Beraturan)	23 (Kasar dan Kusam)	1 (Buram)	2 (Meninggi)	negatif	Kokus	-
ZR5	1 (Bulat)	3 (Kusam)	1 (Buram)	3 (Membukit)	negatif	Kokus	+
ZR6	1 (Bulat)	3 (Kusam)	1 (Buram)	1 (Datar)	negatif	Basil	+
NAR1	1 (Bulat)	3 (Kusam)	1 (Buram)	2 (Meninggi)	negatif	Basil	+
NAR2	2 (Tidak Beraturan)	3 (Kusam)	1 (Buram)	2 (Meninggi)	negatif	Kokus	+
NAR3	1 (Bulat)	3 (Kusam)	1 (Buram)	1 (Datar)	negatif	Diplobasil	-
NAR4	2 (Tidak Beraturan)	3 (Kusam)	1 (Buram)	3 (Membukit)	negatif	Diplobasil	+
PCAR1	2 (Tidak Beraturan)	3 (Kusam)	1 (Buram)	3 (Membukit)	positif	Kokus	+
PCAR2	2 (Tidak Beraturan)	23 (Kasar dan Kusam)	1 (Buram)	3 (Membukit)	negatif	Diplokokus	+
PCAR3	1 (Bulat)	3 (Kusam)	1 (Buram)	2 (Meninggi)	negatif	Basil	+
PCAR4	2 (Tidak Beraturan)	3 (Kusam)	1 (Buram)	2 (Meninggi)	negatif	Basil	+

Keterangan: ZR: Media *Zobell marine agar*, NAR: Media *Nutrient agar*, PCAR: Media *Plate count agar*

Tabel 3. Morfologi isolat bakteri yang diisolasi pada media ISP-1, ISP-2 dan SMP

Kode Isolat	Morfologi isolat				Pewarnaan		
	Bentuk	Permukaan	Warna	Elevasi	Gram	Bentuk Sel	Katalase
SMPR1	1 (Bulat)	23 (Kasar dan Kusam)	1 (Buram)	3 (Membukit)	negatif	Diplokokus	-
SMPR2X	2 (Tidak Beraturan)	23 (Kasar dan Kusam)	1 (Buram)	4 (Berkawah)	positif	Basil	+
SMPR2Y	2 (Tidak Beraturan)	23 (Kasar dan Kusam)	4 Berwarna (Kuning)	4 (Berkawah)	positif	Diplokokus	+
SMPR3	2 (Tidak Beraturan)	3 (Kusam)	1 (Buram)	2 (Meninggi)	negatif	Diplokokus	+
SMPR4	1 (Bulat)	3 (Kusam)	1 (Buram)	2 (Meninggi)	negatif	Diplokokus	+
SMPR5	1 (Bulat)	3 (Kusam)	1 (Buram)	1 (Datar)	negatif	Kokus	+
SMPR6	2 (Tidak Beraturan)	23 (Kasar dan Kusam)	1 (Buram)	1 (Datar)	positif	Basil	+
SMPR7	1 (Bulat)	23 (Kasar dan Kusam)	1 (Buram)	3 (Membukit)	negatif	Diplokokus	-
SMPR8	1 (Bulat)	3 (Kusam)	13 (Buram dan Berawan)	1 (Datar)	negatif	Basil	+
SMPR9	2 (Tidak Beraturan)	23 (Kasar dan Kusam)	13 (Buram dan Berawan)	3 (Membukit)	negatif	Kokus Berantai	+
SMPR10	1 (Bulat)	3 (Kusam)	1 (Buram)	2 (Meninggi)	positif	Kokus	+
ISP1R-1	1 (Bulat)	3 (Kusam)	1 (Buram)	3 (Membukit)	negatif	Kokus	-
ISP1R-2	1 (Bulat)	3 (Kusam)	1 (Buram)	2 (Meninggi)	negatif	Basil	+
ISP1R-3	2 (Tidak Beraturan)	23 (Kasar dan Kusam)	1 (Buram)	3 (Membukit)	positif	Kokus Berantai	-
ISP1R-4	1 (Bulat)	23 (Kasar dan Kusam)	1 (Buram)	3 (Membukit)	positif	Kokus	+
ISP2R-1	1 (Bulat)	3 (Kusam)	1 (Buram)	4 (Berkawah)	negatif	Kokus	+
ISP2R-2	2 (Tidak Beraturan)	3 (Kusam)	1 (Buram)	2 (Meninggi)	negatif	Kokus	-
ISP2R-3	1 (Bulat)	3 (Kusam)	1 (Buram)	2 (Meninggi)	negatif	Basil	+

Evaluasi aktivitas antibakteri dari isolat yang berasosiasi dengan *E. spinosum*

Skринing antibakteri dengan metode *perpendicular streak* menunjukkan bahwa 22 isolat dari 32 isolat (68.75%) yang aktif menghambat sekurangnya satu bakteri uji. Sedangkan, 10 isolat lainnya tidak membentuk jarak dengan bakteri uji. Sehingga kesepuluh isolat bakteri ini dikategorikan tidak memiliki aktivitas antibakteri. Isolat bakteri yang membentuk zona hambat terhadap sekurangnya satu bakteri uji terindikasi memiliki aktivitas antibakteri (Tabel 4).

Tabel 4. Zona Hambat Isolat dari *E. spinosum* (mm) terhadap bakteri uji berdasarkan metode *perpendicular streak*.

No	Kode Sampel	<i>E. coli</i>	<i>K. pneu</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>
1	ZR1	-	2,44	1,91	2,83
2	ZR2	2,39	2,08	1,12	1,55
3	ZR3	0,34	2,50	-	-
4	ZR4	1,34	0,85	2,11	-
5	ZR5	1,76	2,34	1,83	0,97
6	PCAR1	-	-	-	9,21
7	PCAR3	1,81	1,29	2,03	-
8	SMPR 1	1,98	3,04	-	-
9	SMPR 2x	-	2,56	2,01	1,37
10	SMPR 2y	3,69	3,93	-	-
11	SMPR 4	1,61	1,27	0,47	-
12	SMPR 6	1,15	0,77	0,71	6,67
13	SMPR 7	-	0,52	-	0,95
14	SMPR 9	1,52	1,61	2,47	7,89
15	SMPR 10	-	1,65	1,26	2,30
16	ISP1R-1	1,23	-	-	1,28
17	ISP1R-2	-	-	-	0,81
18	ISP1R-3	1,64	1,52	-	-
19	ISP1R-4	1,57	1,28	1,53	2,03
20	ISP2R-1	1,46	-	-	-
21	ISP2R-2	2,58	1,16	2,3	1,55
22	ISP2R-3	-	0,76	0,95	0,94

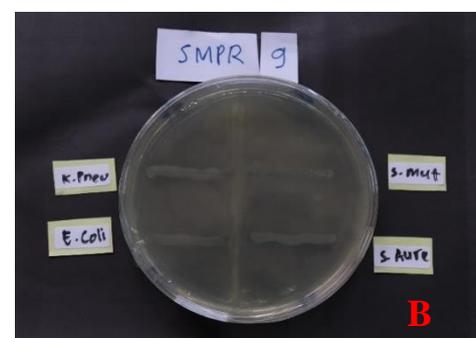
Tabel 4 menunjukkan isolat yang mampu menghambat bakteri uji *E. coli* tertinggi adalah isolat dengan kode SMPR2Y dengan zona hambat sebesar 3,69 mm diikuti dengan isolat ISP2R-2 dan ZR2 dengan zona hambat berturut-turut sebesar 2,58 mm dan 2,39 mm. Sedangkan isolat yang memiliki zona hambat terkecil

terhadap bakteri uji *E. coli* adalah isolat dengan kode ZR3 sebesar 0,34 mm.

Isolat yang mampu menghambat bakteri uji *K. pneumoniae* tertinggi adalah isolat dengan kode SMPR2Y dengan zona hambat sebesar 3,93 mm diikuti dengan isolat SMPR1 dan SMPR2X dengan zona hambat berturut-turut sebesar 3,04 mm dan 2,56 mm. Sedangkan isolat yang memiliki zona hambat terkecil terhadap bakteri uji *K. pneumoniae* adalah isolat dengan kode SMPR7 sebesar 0,52 mm.

Isolat yang mampu menghambat bakteri uji *S. aureus* tertinggi adalah isolat dengan kode SMPR9 dengan zona hambat sebesar 2,47 mm diikuti dengan isolat ISPR2-2 dan isolat ZR4 dengan zona hambat berturut-turut 2,30 mm dan 2,11 mm. Sedangkan isolat yang memiliki zona hambat terkecil terhadap bakteri uji *S. aureus* adalah isolat dengan kode SMPR4 sebesar 0,47 mm.

Isolat yang mampu menghambat bakteri uji *S. mutans* tertinggi adalah isolat dengan kode PCAR1 dengan zona hambat sebesar 9,21 mm diikuti dengan isolat SMPR9 dan SMPR6 dengan zona hambat berturut-turut 7,89 mm dan 6,67 mm. Sedangkan isolat yang memiliki zona hambat terkecil terhadap bakteri uji *S. mutans* adalah isolat ISP1R-2 sebesar 0,81 mm.





Gambar 3. Isolat dengan daya hambat tertinggi untuk setiap bakteri uji. A. PCAR1, B. SMPR 9, C. SMPR 6, SMPR2Y

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini sebanyak 32 isolat bakteri yang berasosiasi dengan rumput laut *E. spinosum* telah diisolasi dengan menggunakan enam jenis media pertumbuhan berbeda. Tujuan penggunaan media tumbuh yang bervariasi adalah untuk mendapatkan sebanyak mungkin koloni bakteri yang bisa diisolasi. Secara umum, kandungan media menentukan jenis bakteri yang bisa ditumbuhkan pada media agar (Sari, 2019). Dalam penelitian ini media agar yang komposisinya tidak mengandung garam laut dilarutkan dengan *artificial seawater* (ASW) yang bertujuan untuk menjaga tekanan osmosis sehingga menyerupai kondisi air laut (Henson *et al.*, 2016). Diharapkan dengan kondisi tekanan osmosis yang sama maka bakteri yang berasosiasi dengan *E. spinosum* dapat tumbuh pada media sintetik.

Koloni yang tumbuh pada media agar cukup bervariasi dan dengan sejumlah koloni memiliki kenampakan visual yang sama. Maka dari itu pemilihan koloni bakteri didasarkan pada metode *colony morphology code* yaitu suatu cara pengelompokan koloni berdasarkan kenampakan morfologinya. Koloni dengan kode CMC yang berbeda diasumsikan berasal dari jenis yang berbeda untuk selanjutnya diamati

dibawah mikroskop. Tiga puluh dua isolat bakteri yang diisolasi mencirikan individu yang unik dan maka dari itu diduga mewakili jenis bakteri yang berbeda. Meskipun jumlah koloni yang didapat cukup bervariasi, sangat disadari bahwa tidak mungkin untuk mengisolasi seluruh bakteri yang berasosiasi dengan *E. spinosum*. Hal ini karena secara natural tidak semua bakteri mampu tumbuh pada kondisi laboratorium khususnya pada media sintetik akibat tidak adanya interaksi dengan bakteri lain ataupun ketiadaan molekul pertumbuhan yang disintesis oleh inangnya yang dikenal sebagai *plate count anomaly* (Reguera, 2016). Hal ini dibuktikan dari hasil penelitian dengan pendekatan *culture-independent approach* yang melaporkan 24 filum bakteri berasosiasi pada rumput laut (Selvarajan *et al.*, 2019). Sedangkan hanya sekitar 0.5% dari jumlah tersebut yang dapat tumbuh pada media agar yang menunjukkan kesenjangan hasil antara pendekatan *culture dependent* dan *culture independent approaches* (Lagier *et al.*, 2015). Seluruh isolat yang diperoleh pada penelitian ini hanya dikarakterisasi secara morfologi tanpa identifikasi secara molekuler sehingga tidak diketahui pengelompokan dari setiap isolat pada tingkatan filum. Amplifikasi dan sekuensing fragmen gen 16S rRNA gen merupakan tahapan lanjutan untuk memastikan identitas jenis dari isolat bakteri yang diperoleh khususnya isolat dengan aktivitas antibakteri.

Skrining antibakteri dari isolat yang berasosiasi dengan *E. spinosum* menjadi tujuan khusus dari penelitian ini untuk mendapatkan isolat potensial dengan sifat antagonis terhadap bakteri uji untuk dikembangkan dalam dapat memproduksi senyawa antibakteri. Metode *perpendicular streak* dipilih karena relatif mudah dikerjakan dan dapat secara efektif menyeleksi aktivitas antibakteri dari suatu isolat tanpa perlu melakukan tahapan ekstraksi (Velho-Pereira & Kamat, 2011). Isolat bakteri yang mampu mensintesis senyawa antibakteri akan mendifusikan molekul aktifnya melalui media agar sehingga bakteri uji tidak akan mampu mendekati koloni dari isolat bakteri. Semakin jauh jarak bakteri uji dari isolat mengindikasikan

aktivitas antibakteri yang kuat dari isolat (Chakraborty *et al.*, 2017).

Potensi bakteri yang berasosiasi dengan rumput laut sebagai sumber senyawa antibakteri telah menjadi fokus studi dalam satu dekade terakhir (Karthick & Mohanraju, 2018; Singh *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2011). Secara mikroskopis enam bakteri yang diisolasi dari media khusus yaitu isolat SMPR2X, SMPR2Y, SMPR6, SMPR10, ISP1R-3, ISP1R-4 memiliki karakteristik menyerupai aktinobakteria yaitu Gram positif, bentuk sel batang dan koloni mencekram agar. Keenam isolat tersebut juga memiliki aktivitas antibakteri yang umum ditemukan pada kelompok Aktinobakteria (Barka *et al.*, 2016). Sejumlah penelitian melaporkan bahwa Aktinobakteria yang berasosiasi dengan rumput laut menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap sejumlah bakteri patogen (Ulfah *et al.*, 2018). Selain kelompok Aktinobakteria, aktivitas antibakteri dari isolat yang berasosiasi dengan rumput laut juga banyak dilaporkan dari jenis bakteri lain seperti *Bacillus* sp (Chakraborty *et al.*, 2017., Purnami *et al.*, 2022).

Pada hasil penelitian ini ditemukan variasi aktivitas antibakteri dari 22 isolat bakteri yang ditampilkan pada Tabel 3. Adanya variasi aktivitas antibakteri dimungkinkan karena setiap isolat memerlukan kondisi optimum pertumbuhan yang tidak secara mutlak dapat diakomodasi menggunakan media umum seperti LB agar. Meskipun demikian, hasil skrining antibakteri pada setiap isolat seperti yang ditunjukkan oleh isolat SMPR2Y, PCAR1, SMPR6 dan SMPR9 telah memberikan informasi awal tentang spesifisitas setiap isolat terhadap setiap jenis bakteri uji Gram positif ataupun Gram negatif. Upaya verifikasi dengan mengujikan kepada jenis bakteri Gram positif dan Gram negatif lainnya akan menjadi tahapan selanjutnya untuk memberikan perspektif yang lebih akurat terkait spesifisitas jenis senyawa metabolit sekunder yang diproduksi oleh setiap isolat.

Hasil penelitian ini secara umum mempertegas potensi bakteri yang berasosiasi dengan rumput laut *E. spinosum* sebagai penghasil senyawa antibakteri. Aktivitas

antibakteri yang terdeteksi, meskipun tergolong relatif kecil pada sebagian besar isolat, menjadi indikasi awal bahwa isolat-isolat bakteri *E. spinosum* berpotensi mensintesis senyawa antibakteri. Fermentasi, ekstraksi dengan pelarut kimia berbeda dan analisis kandungan ekstrak merupakan tahapan lanjutan untuk mengetahui potensi sintesis senyawa antibakteri dan potensi bioaktivitas lain seperti antivirus, antijamur, antikanker, dan antioksidan.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini berhasil mengisolasi 32 isolat bakteri dari rumput laut *Eucheuma spinosum* dengan sebaran 14 isolat berasal dari media umum dan 18 isolat berasal dari media khusus yang menargetkan aktinobakteria. Dua puluh dua isolat bakteri mampu menghambat sekurangnya satu bakteri berdasarkan uji *perpendicular streak* dengan isolat PCAR1 dan SMPR9 menunjukkan daya hambat tertinggi terhadap bakteri uji *S. mutans*.

SARAN

Penelitian lanjutan akan difokuskan untuk mengidentifikasi isolat dengan aktivitas antibakteri terbaik menggunakan metode sekuensing gen 16S rRNA dan karakterisasi lanjutan yang meliputi optimasi pertumbuhan isolat, fermentasi, ekstraksi senyawa aktif dan pengujian ekstrak dari setiap isolat terbaik untuk memverifikasi aktivitas antibakteri yang telah diamati.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas hibah penelitian yang diberikan oleh Unit Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (UPPM) Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Warmadewa no hibah: 382/Unwar/FKIK/PD-13/IV/2021.

DAFTAR PUSTAKA

Anggadiredja, T.A., H. Zalnika., Purwoto, dan Istini. 2009. Rumput laut. Penebar

- Swadaya. Jakarta.
- Aslan, L. M. 1998. *Budidaya Rumput Laut*, Indonesia: Kanisius, Yogyakarta.
- Ausubel, F.M., R. Brent., R.E. Kingston., D.D. Moore, J.G. Seidman, and J.A. Smith. 1994. *In: K. Struhl (ed.). Current protocols in molecular biology*, vol. 1. USA: Green Publishing Associates, Inc., Brooklyn, N.Y.
- Barka, E.A., P. Vatsa., L. Sanchez., N. Gaveauvaillant., C. Jacquard., H. Klenk., C. Clément., Y. Ouhdouch, and P. V. Wezel. 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80(1): 1–43.
- Beveridge, T. J. 2001. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*. 76 (3)
- Bolinches, J., M.L Lemos, and J.L Barja. 1988 Population dynamics of heterotrophic bacterial communities associated with *Fucus vesiculosus* and *Ulva rigida* in an estuary. *Microbial Ecology* 15: 345–357.
- Chakraborty, K., B. Thilakan, and V.K. Kizhakkekalam. 2017. Antibacterial aryl-crowned polyketide from *Bacillus subtilis* associated with seaweed *Anthophycus longifolius*. *Journal of Applied Microbiology*. 124(1): 108-125.
- Chakraborty, K., B. Thilakan, and V. K. Raola (2017). Phytochemistry Antimicrobial polyketide furanoterpenoids from seaweed-associated heterotrophic bacterium *Bacillus subtilis* MTCC 10403. *Phytochemistry*. 142: 112–125.
- De Koster, S., J.P.R. Ruiz., S.G. Rajakani., C. Lammens., Y. Glupczynski., H. Goossens and B.B Xavier. 2022. Diversity in the Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* ST101 of Human, Environmental, and Animal Origin. *Frontiers in Microbiology*. 13: 838207.
- Ginting, E.L., L Rangan., L.Wantania, and S. Wullur. 2019. Isolation of Symbiotic Bacteria with Red Algae from Tongkaina Waters, North Sulawesi. *Jurnal Ilmiah Platax*, 7(2): 395.
- Henson, M.W., D.M. Pitre., J.L. Weckhorst., V. C. Lanclos., A.T. Webber, and J.C. Thrash. 2016. Artificial Seawater Media Facilitate Cultivating Members of the Microbial Majority from the Gulf of Mexico. *mSphere*. 1(2): 1–10.
- Hollants, J., F. Leliaert., O.D. Clerck, and A. Willems. 2013. What We Can Learn from Sushi: A Review on Seaweed-bacterial Associations. *FEMS Microbiology Ecology*, 83: 1-16
- Hudha, M.I., R. Sepdwiyantri, and S.D. Sari. 2012. Ekstraksi Karaginan dari Rumput Laut (*Euclima spinosum*) dengan Variasi Suhu Pelarut dan Waktu Operasi. *Jurnal Teknik Kimia*, 6(2): 17–20.
- Delvia, F., A. Fridayanti, and A. Ibrahim. 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (Bal) Dari Buah Mangga (*Mangifera indica* L.). 1(2): 159–163. *Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*.
- Indraningrat, A.A.G., S. Micheller., M. Runderkamp., I. Sauerland., L. E. Becking., H. Smidt, and D. Sipkema. 2019. Cultivation of Sponge-Associated Bacteria from *Agelas sventres* and *Xestospongia muta* Collected from Different Depths. *Marine Drugs*, 17(10).
- Indraningrat, A.A.G., M.D. Wijaya., P.A. Suryanditha., A. S. Siskayani, and N.M. D. Janurianti. 2021. Antibacterial Screening of Bacterial Isolates Associated with Mangrove Soil from the Ngurah Rai Mangrove Forest Bali. *Biology, Medicine, & Natural Product Chemistry*. 10(2): 129–133.
- Karthick, P, and R. Mohanraju, 2018. Antimicrobial Potential of Epiphytic Bacteria Associated With Seaweeds of Little Andaman, India. *Frontiers of Microbiology*. 9(611): 1–11.
- Krzyściak, W., A. Jurczak., D. Kościelniak., B. Bystrowska, and A. Skalniak. 2014. The

- virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *European Journal Clinical Microbiology Infections Diseases*. 33: 499–515.
- Lagier, J., S. Edouard., I. Pagnier., O. Mediannikov., M. Drancourt, and D. Raoult. 2015. Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 28(1): 208–236.
- Lozano, C., H. Gharsa., K.B. Slama., M. Zarazaga, and C. Torres. 2016. *Staphylococcus aureus* in Animals and Food: Methicillin Resistance, Prevalence and Population Structure. A Review in the African Continent. *Microorganisms*, 4(1): 12.
- Nandina, R. Q., dan S. Pujiyanto. 2019. Skrining Aktivitas Antibakteri and Identifikasi Molekuler Berdasarkan Gen 16S rRNA Isolat Aktinomiset Asal Pulau Enggano dan Bali. *Berkala Bioteknologi*, 2(2).
- Purnami, PPCP., A.A.G Indraningrat, and I.B.G. Darmayasa. 2022. Antibacterial activity screening of bacterial isolates associated with seaweed *Euचेuma cottonii* from coastal area in Buleleng, Bali. *Journal of Tropical Biology*. 10(2): 132-140.
- Rahmayanti, S., R. Massinai, and M. Supriadi, 2019. Kepadatan Bakteri Symbion Rumput Laut (*Euचेuma spinosum*) yang Berasal dari Perairan Puntondo, Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan. *Prosiding Simposium Nasional Kelautan dan Perikanan*, 6.
- Ramos, S., V. Silva., M.d.L.E. Dapkevicius., M. Caniça., M.T. Tejedor-Junco., G. Igrejas, and P. Poeta. 2020. *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Production. *Animals*. 10: 2239.
- Reguera, G. 2016. The Great Plate Count Anomaly. *In the Company of Microbe*. 288–291.
- Sari, L. P. 2019. Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri dengan Menggunakan Umbi Jalar Cilembu (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) untuk Bakteri *Lactobacillus acidophilus*, *Salmonella typhii* dan *Escherichia coli*. (Skripsi). Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Selvarajan, R., T. Sibanda., S. Venkatachalam., H.J.O. Ogola., C. Obieze., and T.A. Msagati. 2019. Distribution, Interaction and Functional Profiles of Epiphytic Bacterial Communities from the Rocky Intertidal Seaweeds, South Africa. *Scientific reports*, 9(1): 19835.
- Singh, R. P., P. Kumari, and C.R.K. Reddy. 2015. Antimicrobial compounds from seaweeds-associated bacteria and fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4):1571–1586.
- Sieburth, J.M. 1968. The influence of algal antibiosis on the ecology of marine microorganisms. *In*. Droop MR & Wood J, eds. advances in microbiology of the sea: 63–94. UK: Academic. Press.
- Supriyanti, E., G.W. Santosa, and L.N. Alamanda. 2018. Pertumbuhan Rumput Laut *Gracilaria* sp. pada Media yang Mengandung Tembaga (Cu) dengan Konsentrasi yang Berbeda. *Buletin Oseanografi Marina*, 7(1):15.
- Taylor, P., F. Persson., R. Svensson., G.M. Nylund., N.J. Fredriksson, and M. Hermansson, 2011. Ecological role of a seaweed secondary metabolite for a colonizing bacterial community. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm*: 27(6): 37–41.
- Ulfah, M., N. Kasanah, and N.S.N. Handayani. 2018. Bioactivity and genetic screening of marine actinobacteria associated with red algae *Gelidiella acerosa*. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 22(1): 13.
- Velho-Pereira, S, and N.M. Kamat. 2011. Antimicrobial Screening of Actinobacteria using a Modified Cross-Streak Method. *Indian Journal of Pharmaceutical sciences*, 73(2): 223–228.