

**JURNAL**

**ISOLASI DAN UJI SENSITIFITAS BAKTERI HETEROTROFIK DARI  
KAWASAN PERAIRAN LAUT DAN ESTUARI BERSALINITAS RENDAH DI  
KABUPATEN SIAK TERHADAP BAKTERI PATOGEN**

**OLEH**

**RIZKI HAMDANI**

**1304115390**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN KELAUTAN  
UNIVERSITAS RIAU  
PEKANBARU  
2018**

# Isolasi Dan Uji Sensitifitas Bakteri Heterotrofik dari Kawasan Perairan Laut Dan Estuari Bersalinitas Rendah Di Kabupaten Siak terhadap Bakteri Patogen

Oleh

Rizki Hamdani <sup>1)</sup>, Feliatra <sup>2)</sup>, Irvina Nurrachmi <sup>2)</sup>

E-mail: rizki.h20@gmail.com

## ABSTRAK

Bakteri heterotrofik adalah bakteri yang memanfaatkan bahan organik sebagai sumber nutrisi. Bakteri ini juga memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni - September 2017. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen (*Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp.) dan mengetahui jenis bakteri heterotrofik pada daerah sampling berdasarkan metode PCR teknik sekuens 16S rRNA. Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan 25 isolat bakteri murni dan hanya 10 isolat yang dilakukan proses sekuensing DNA. Isolat bakteri H2, H4, H8, H10, H12, H15, H16, H17 dan H24 mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan tergolong dalam tiga kategori yakni kategori kuat (10-20 mm), kategori sedang (5-10 mm) dan kategori lemah ( $\leq 5$  mm). Berdasarkan analisis 16S rRNA diketahui bahwa 10 isolat teridentifikasi termasuk bakteri *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan tingkat homologi berkisar 81-99%. Berdasarkan hasil uji regresi linear sederhana menunjukkan hubungan antara jumlah bakteri heterotrofik dengan parameter lingkungan yang diukur dalam katagori sangat lemah ( $r = 0,19$ ).

Kata Kunci : bakteri heterotrofik, antibakteri, analisis molekuler, 16S rRNA

---

<sup>1)</sup>Mahasiswa Fakultas Perikanan dan kelautan Universitas Riau, Pekanbaru

<sup>2)</sup>Dosen Fakultas Perikanan dan kelautan Universitas Riau, Pekanbaru

# Isolation And Sensitivity Test of Heterotrophic Bacteria From Marine and Estuary Waters of Low Salinity In Siak against Pathogenic Bacteria

By

**Rizki Hamdani <sup>1)</sup>, Feliatra <sup>2)</sup>, Irvina Nurrachmi <sup>2)</sup>**

E-mail: rizki.h20@gmail.com

## ABSTRACT

Heterotrophic bacteria are a bacteria that use organic matter as a source of nutrients. It also has potential as antibacterial to pathogenic bacteria. The research was conducted from June to September 2017. The aim of this research was to determine the ability of bacterial isolates to inhibit the growth of pathogenic bacteria (*Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas* sp.) and determine the species of heterotrophic bacteria in the research area based on PCR method of 16S rRNA sequence. The results showed that twenty five pure bacteria isolates and only ten isolates could be sequenced. Bacterial isolates H2, H4, H8, H10, H12, H15, H16, H17 and H24 were able to inhibit the growth of pathogenic bacteria and were classified into three categories namely strong category (10-20 mm), medium category (5-10 mm) and weak category ( $\leq 5$  mm). Based on the 16S rRNA analysis, it was found that ten identified isolates included *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, and *Pseudomonas aeruginosa* with a homology level of 81-99%. Based on the results of simple linear regression test showed the relationship between the number of heterotrophic bacteria with environmental parameters measured in the very weak category ( $r = 0,19$ ).

Keywords: heterotrophic bacteria, antibacterial, molecular analysis, 16S rRNA

---

<sup>1</sup> Student Faculty of Fisheries and Marine University of Riau, Pekanbaru

<sup>2</sup> Lecture Faculty of Fisheries and Marine University of Riau, Pekanbaru

## PENDAHULUAN

Kabupaten Siak merupakan salah satu kabupaten yang memiliki wilayah laut di Provinsi Riau yaitu salah satunya berada di Kecamatan Sungai Apit yang digunakan sebagai jalur transportasi kapal-kapal. Padatnya kegiatan transportasi di perairan tersebut akan memberikan dampak terhadap organisme di dalamnya. Selain itu, Kabupaten Siak dibelah oleh salah satu sungai terbesar di Provinsi Riau yaitu Sungai Siak. Perairan ini memiliki peran yang sangat penting dalam mendukung aktivitas masyarakat dan industri di Riau. Aktivitas di sekitar Daerah Aliran Sungai (DAS) Siak dianggap sebagai penyumbang bahan organik maupun anorganik yang masuk ke perairan sungai dan terakumulasi di muara sungai.

Keterlibatan mikroorganisme di lingkungan perairan tidak dapat diabaikan karena bakteri heterotrofik mampu memanfaatkan bahan organik pada lingkungan tempat tumbuhnya sebagai sumber nutrisi. Pada siklus biogeokimia di perairan, bakteri heterotrofik memiliki peran sebagai dekomposer untuk menghasilkan mineral-mineral sebagai *nutrient*.

Keberadaan mikroorganisme tersebut ada yang bermanfaat bagi kehidupan manusia, tetapi banyak pula yang merugikan manusia misalnya dapat menimbulkan berbagai penyakit atau bahkan dapat menimbulkan kerusakan akibat kontaminasi yang biasanya disebut bakteri patogen. Menurut Feliatra *et al.*, (2012) kehadiran jenis bakteri patogen seperti *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., dan *Pseudomonas* sp akan menyebabkan penyakit pada ikan budidaya sehingga perlu diantisipasi untuk pencegahannya.

Banyak penelitian telah dilakukan untuk mencegah kerugian yang diakibatkan oleh bakteri patogen yaitu dengan menggunakan senyawa antimikroba.

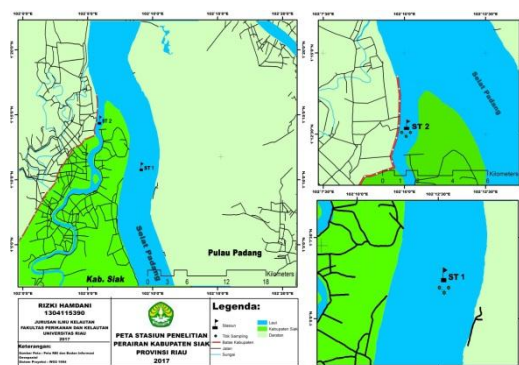
Senyawa antimikroba dapat diperoleh dari tanaman, hewan atau dihasilkan oleh mikroba yang umumnya dikenal dengan istilah biopreservatif. Berdasarkan hal tersebut, penulis tertarik untuk melakukan penelitian tentang isolasi dan uji sensitifitas bakteri heterotrofik dari kawasan perairan laut dan perairan estuari bersalinitas rendah di Kabupaten Siak terhadap bakteri patogen.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen (*Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp.) serta mengetahui jenis bakteri heterotrofik pada daerah sampling.

## METODELOGI PENELITIAN

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni - September 2017 untuk pengambilan sampel dilakukan di kawasan perairan laut dan estuari bersalinitas rendah Kabupaten Siak, Provinsi Riau. Kegiatan analisis dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Laut Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan kemudian uji DNA dilakukan di Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau. Proses Sekuensing dianalisis di PT. Genetika Science Indonesia Jakarta Barat.



Gambar 1. Peta Lokasi Stasiun Penelitian

## Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode survei dimana air dari perairan laut dengan salinitas 27 ppt dan estuari dengan salinitas 10 ppt di Kabupaten Siak digunakan sebagai sampel penelitian dan dilakukan identifikasi uji biokimia serta uji antagonis terhadap 3 bakteri patogen yang berbeda yaitu *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. kemudian diidentifikasi menggunakan Metode PCR 16S rDNA.

Data yang diperoleh dari hasil isolasi, identifikasi, analisis dan disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Data kemudian dibahas secara diskriptif berdasarkan literatur untuk diambil suatu kesimpulan.

## Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada dua stasiun, pada setiap stasiun ditetapkan tiga titik sampling, jarak setiap titik sampling adalah 50 meter. Pengambilan sampel pada penelitian ini adalah sampel air laut yang berada di kolom perairan dengan menggunakan *Van dorn water sampler* dengan kedalaman sekitar 10 m, selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam botol gelap lalu disimpan dalam *ice box* pada suhu sekitar 4°C.

## Isolasi Bakteri

Sampel air laut diambil sebanyak 1 mL, lalu dimasukkan kedalam larutan fisiologis (NaCl 0,9%) untuk memperoleh pengenceran  $10^{-1}$  sampai  $10^{-6}$ . Kemudian pada pengenceran  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  dan  $10^{-6}$  diambil sebanyak 1 mL dan ditumbuhkan pada media padat *Nutrien Agar* (NA). Media yang ditumbuhkan bakteri diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu 28 – 30 °C didalam inkubator dengan posisi cawan terbalik.

## Perhitungan Bakteri Heterotrofik

Perhitungan bakteri heterotrofik menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC), dengan menggunakan rumus Fardiaz (1992) :

$$\text{Jumlah Bakteri (cfu/mL)} = A \times \frac{0,1}{B}$$

Keterangan :

A = Jumlah Koloni

B = Faktor Pengenceran

## Identifikasi Bakteri

Isolat bakteri yang didapat diidentifikasi secara morfologi dan biokimia. Pengamatan morfologi meliputi bentuk sel, warna koloni, ukuran koloni dan tipe koloni. Uji biokimia meliputi pewarnaan gram, uji katalase, uji methyl red, uji motilitas, uji indol, uji sitrate uji sulfida (H<sub>2</sub>S) dan uji TSIA.

## Uji Sensitifitas

Bakteri patogen uji yang telah di murnikan diambil sebanyak 1 mL dan ditanam kedalam media NA dan diratakan homogen. Setelah media yang berisi biakan bakteri patogen memadat diberi kertas cakram yang ditetesi dengan larutan antibiotik yakni Amoxan @500g sebagai kontrol positif dan kertas cakram yang ditetesi media NB sebanyak 0,5 µl sebagai kontrol negatif dan kertas cakram yang ditetesi isolat 0,5 µl dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Besarnya aktivitas antibakteri ditentukan dengan cara mengukur diameter zona bening di sekitar cakram.

## Uji Molekuler

Isolasi DNA bakteri heterotrofik dilakukan melalui proses ekstraksi. Dalam mengekstraksi DNA bakteri heterotrofik, menggunakan metode 16S rRNA.

Amplifikasi PCR volume 50 µl dilakukan dengan menggunakan Primer 24F: S' AGA GTT TGA TCC TGG CT 3' dan 1541R: S' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3' dengan cara DNA diambil sebanyak 1 µl di pindahkan ke dalam tabung PCR berukuran 0,2 ml kemudian dimasukkan 49 µl Master Mix. Selanjutnya dimasukkan kedalam *thermocycler* (mesin PCR). Proses Pra PCR dijalankan pada suhu 94°C selama 3 menit. Dalam proses amplifikasi terbagi menjadi beberapa tahapan, yaitu denaturasi pada suhu 94°C selama 30 menit, *annealing* pada suhu 50 °C selama 45 menit dan *extension* pada suhu 72 °C selama 1 menit 30 dtk.

Metode elektroforesis yang digunakan yaitu dengan gel agarose. Pada proses ini dikelompokkan menjadi tiga tahapan yakni: pertama, persiapan gel agarose dengan konsentrasi agarose yang disesuaikan dengan ukuran DNA fragmen yang akan dipisahkan ; kedua, DNA sampel dimasukkan ke dalam lubang gel dan gel diletakkan di bak elektroforesis yang dialiri listrik sehingga menghasilkan pemisahan yang baik ; ketiga, gel direndam dalam larutan TBE ( *Tris Borate* EDTA) 1x yang telah digunakan pada gel penyangga elektroforesis. Kemudian gel agarose diletakkan di atas UV transiluminator untuk dilakukan pengamatan band yang terbentuk.

Sampel yang telah didapat selanjutnya dilakukan purifikasi dan proses sekensing untuk memperoleh data *sequence* DNA bakterinya.

### Analisis Sekuen

Data yang diperoleh dari hasil *sequence* dianalisis menggunakan teknik BLAST yaitu mencocokkan *sequence* DNA bakteri yang ada di *Gen Bank* melalui *website* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> dengan Aplikasi Mega 6 dan *Bioedit*.

Selanjutnya untuk mengetahui hubungan jumlah bakteri dengan parameter

lingkungan dilakukan uji statistik yaitu uji regresi linear sederhana dengan persamaan

$$y = a + bx$$

Keterangan:

y : Jumlah Bakteri Heterotrofik (CFU/ml)

a dan b : konstanta

x : konsentrasi parameter kualitas perairan

Dan untuk mengetahui keeratan hubungannya digunakan koefisien korelasi (r) dimana nilai r berada antara 0-1. Nilai keeratan hubungan koefisien korelasi merujuk pada Colton *dalam* Tanjung (2014), dimana:

- 0,00 – 0,199 : Hubungan sangat lemah
- 0,20 – 0,399 : Hubungan lemah
- 0,40 – 0,599 : Hubungan sedang
- 0,60 – 0,799 : Hubungan kuat
- 0,80 – 1,000 : Hubungan sangat kuat

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Parameter Kualitas Perairan

**Tabel 1. Pengukuran Kualitas Perairan**

ST	Kordinat	pH	Salinitas (ppt)	Kecerahan (cm)	Suhu (°C)	Arus (m/dtk)	DO (mg/L)
I	N: 01° 06' 41,6" E: 102° 12' 19,2"	6,5	27	23,5	29	0,5	6,2
II	N: 01° 12' 26" E: 102° 09' 53,7"	6	10	15	28	0,3	5,24

Berdasarkan pengukuran kualitas perairan di daerah sampling (Tabel 1) diketahui bahwa secara keseluruhan parameter kimia yang diperoleh cukup baik untuk kehidupan bakteri heterotrofik. Pada parameter suhu yang diamati diperoleh suhu pada masing-masing stasiun sekitar 29 dan 28°C. Menurut laporan Kementerian Lingkungan Hidup (2004), suhu yang umum dijumpai di perairan laut Indonesia berkisar antara 27-32°C. Suhu ini juga masih sesuai untuk kehidupan biota laut yang berkisar antara 28-32°C dan diperbolehkan terjadi perubahan sampai

dengan  $< 2^{\circ}\text{C}$  dari suhu alami. Pernyataan ini sejalan dengan Souhoka dan Patty (2013) yang menyatakan variasi suhu perairan untuk biota tropik tergolong wajar apabila nilainya berkisar antara  $25,6-32,3^{\circ}\text{C}$ .

Kandungan gas oksigen terlarut dalam air mempunyai peranan menentukan untuk kelangsungan hidup organisme akuatis dan untuk berlangsungnya proses reaksi kimia yang terjadi di dalam badan perairan. Hasil pengukuran DO (*Dissolved Oxygen*) diperoleh masing-masing sekitar  $5,24-6,2$  mg/L. Rivai dalam Souhoka dan Patty (2013) menyatakan bahwa pada umumnya kandungan oksigen sebesar 5 mg/L dengan suhu air berkisar antara  $20-30^{\circ}\text{C}$  relatif masih baik untuk kehidupan ikan-ikan, bahkan apabila dalam perairan tidak terdapat senyawa-senyawa yang bersifat toksik (tidak tercemar) kandungan oksigen sebesar 2 mg/L sudah cukup untuk mendukung kehidupan organisme perairan.

### Jumlah Bakteri Heterotrofik

Bakteri heterotrofik yang diisolasi dari sampel air dihitung koloninya yang disajikan pada Tabel 2.

**Tabel 2. Jumlah Bakteri Heterotrofik (CFU/ml) pada Perairan Selat Padang dan Muara Sungai Siak**

Stasiun	Titik Sampling	Jumlah Bakteri Heterotrofik (CFU/ml)
I	1	$14,3 \times 10^7$
	2	$12,7 \times 10^7$
	3	$19,7 \times 10^7$
	<b>Rata-rata</b>	<b><math>15,5 \times 10^7</math></b>
II	1	$14,2 \times 10^7$
	2	$11 \times 10^7$
	3	$24,6 \times 10^7$
	<b>Rata-rata</b>	<b><math>16,6 \times 10^7</math></b>

CFU : *Colony Forming Unit*

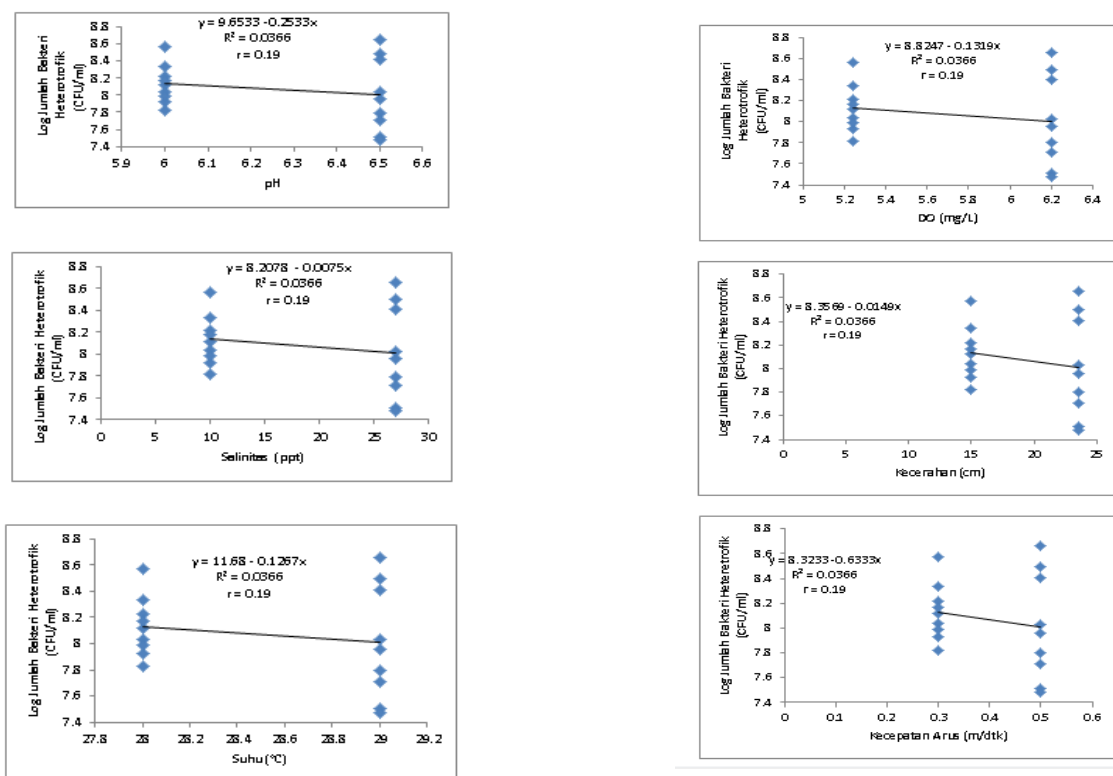
Jumlah koloni bakteri heterotrofik cenderung tidak terlalu berbeda jauh antar kedua stasiun. Koloni bakteri terbanyak terlihat pada stasiun II dengan jumlah rata-rata bakteri  $16,6 \times 10^7$ , sedangkan pada stasiun I memiliki rata-rata jumlah koloni bakteri  $15,5 \times 10^7$ .

### Hubungan Jumlah Bakteri Heterotrofik dengan Parameter Kualitas Perairan

Berdasarkan hasil analisis statistik menggunakan persamaan regresi linier sederhana, hubungan antara parameter lingkungan yang diukur dan jumlah bakteri heterotrofik menunjukkan nilai yang sama diantara masing-masing parameter lingkungan yaitu koefisien determinasi ( $R^2$ ) bernilai 0,0366 dan koefisien korelasi ( $r$ ) bernilai 0,19 (Gambar 2.)

Merujuk pada nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ), menunjukkan bahwa masing-masing parameter lingkungan memiliki pengaruh sebesar 3,66 % terhadap jumlah bakteri heterotrofik sementara 96,34 % lainnya dipengaruhi oleh faktor lain seperti kandungan nitrat dan fosfat serta bahan organik. Menurut Sari (2017) selain tergantung pada faktor-faktor lingkungan, bakteri heterotrofik juga sangat bergantung pada bahan organik yang ada di perairan.

Adapun nilai koefisien korelasi ( $r$ ) menunjukkan nilai 0,19 yang berarti memiliki hubungan yang positif sangat lemah. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan Colton dalam Tanjung (2014), bahwa kriteria keeratan hubungan koefisien korelasi dengan nilai antara 0,00-0,199 hubungannya sangat lemah.



Gambar 2. Grafik Regresi Linear Sederhana Setiap Parameter Lingkungan

### Identifikasi Morfologi dan Uji Biokimia

Pengamatan morfologi koloni bakteri menunjukkan hampir tidak memiliki perbedaan yang mencolok antara isolat bakteri tersebut. Isolat bakteri tersebut memiliki diameter koloni berkisar antara 0,5-1,5 cm. Dari hasil pengamatan dapat diketahui memiliki warna koloni putih susu dan putih kekuningan (Tabel 3.)

Tabel 3. Morfologi Koloni Bakteri

No	Nama isolat	Diameter (cm)	Warna	Bentuk Koloni	Pinggiran	Permukaan
1	H2	0,6	Putih Susu	Bundar	Licin	Timbul
2	H4	1,5	Putih Susu	Bundar	Licin	Timbul
3	H8	0,5	Putih Susu	Bundar	Licin	Timbul
4	H9	0,5	Putih Susu	Bundar	Licin	Timbul
5	H10	0,8	Putih Kekuningan	Bundar	Licin	Datar
6	H12	1	Putih Kekuningan	Bundar	Berombak	Datar
7	H15	0,8	Putih Susu	Bundar Tepian Karang	Tak Beraturan	Cembung
8	H16	0,8	Putih	Bundar	Licin	Datar
9	H17	1	Putih Susu	Bundar	Licin	Timbul
10	H24	0,7	Putih Susu	Bundar	Licin	Timbul

Bentuk koloni yang diperoleh memiliki bentuk bundar dan bentuk bundar dengan tepian karang. Pada pengamatan pinggiran koloni teridentifikasi memiliki pinggiran licin, berombak dan pinggiran yang tak beraturan. Sedangkan pada pengamatan permukaan koloni bakteri, memiliki permukaan timbul, datar, dan cembung.



**Tabel 4. Uji Biokimia dari masing masing isolat**

		Kode Sampel									
		H2	H4	H8	H9	H10	H12	H15	H16	H17	H24
Uji Biokimia											
	Gram	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Motilitas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	MR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	Citrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TSIA	T	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
	M <sub>1</sub>	M	M	M	M	M	M	K	M	M	K
Uji Gula											
	Glukosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	Laktosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sukrosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Keterangan :**

- MR : Uji Methyl Red  
 - : Uji bersifat Negatif  
 + : Uji bersifat Positif  
 T : Tegak  
 M<sub>1</sub> : Posisi agar miring  
 K : Berwarna kuning  
 M : Berwarna merah

Secara umum isolat bakteri yang didapatkan adalah 9 Isolat bakteri tersebut Gram positif dan 1 isolat Gram negatif, katalase positif, bersifat motil, indol negatif, mampu memfermentasi citrate, 1 isolat menghasilkan sulfida, sedangkan pada uji *Methyl Red* 9 isolat bersifat negatif dan 1 isolat bersifat positif. Pada uji gula teridentifikasi 2 isolat yang mampu memfermentasi glukosa (Tabel 4).

**Sensitifitas Isolat Bakteri**

Berdasarkan uji sensitifitas (Tabel 5.) yang dilakukan bahwa isolat bakteri memiliki kemampuan untuk menekan pertumbuhan bakteri patogen yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat pada media uji. Semakin besar diameter zona bening yang dihasilkan dalam uji *in vitro*, maka semakin kuat daya hambat suatu antimikroba

Menurut Greenwood *dalam* Susana (2017), bahwa klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri apabila diameter zona hambat lebih besar dari 20 mm maka respon hambatan pertumbuhannya sangat kuat, apabila diameter zona hambat berkisar antara 10-20 mm maka respon hambatan pertumbuhannya dikategorikan kuat, apabila diameter zona hambat berkisar antara 5-10 mm maka respon hambatan pertumbuhannya dikategorikan sedang, sedangkan diameter zona hambat lebih kecil dari 5 mm maka respon hambatan pertumbuhannya dikategorikan lemah.

Dilihat dari respon hambat untuk pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*, menunjukkan bahwa 6 isolat tergolong memiliki respon hambat yang kuat yaitu isolat H2, H4, H8, H12, H15, dan H16. Nilai daya hambat yang paling tinggi terdapat pada isolat H12 dengan rata-rata diameter sekitar 15,3 mm.

Respon hambat untuk pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, menunjukkan bahwa isolat H8 memiliki respon hambat yang paling tinggi dengan rata-rata diameter sekitar 7,2 mm dan termasuk katagori sedang.

Tabel 5. Hasil Uji Antagonisme Isolat Bakteri terhadap Bakteri Patogen

BAKTERI UJI ISOLAT	Diameter zona hambat (mm)														
	<i>V. alginolyticus</i>					<i>A. hydrophila</i>					<i>Pseudomonas sp.</i>				
	(+)	U <sub>1</sub>	U <sub>2</sub>	U <sub>3</sub>	R(mm)	(+)	U <sub>1</sub>	U <sub>2</sub>	U <sub>3</sub>	R(mm)	(+)	U <sub>1</sub>	U <sub>2</sub>	U <sub>3</sub>	R(mm)
H2	6	14	12	13	13	4	7	6,5	6,5	6,7	5	7	6,5	7,5	7
H4	3,5	11	12,5	14,5	12,6	3,5	1	2	2	1,7	3	5	12,5	11	9,5
H8	7,5	12	11	11,5	11,5	7	11	6	4,5	7,2	6	6	10,5	11	9,2
H9	9	0	3	4	2,3	6,5	5,5	5	4,5	5	2	6,5	7	5,5	6,3
H10	8	5	5	6	5,3	5,5	7	6	5,5	6,2	7	7,5	8	9,5	8,3
H12	6	15	16,5	14,5	15,3	10	5,5	3,5	4	4,3	2	11,5	6	7	8,2
H15	7	13	9,5	9	10,5	7,5	4	2	3,5	3,2	7	6	4	5,5	5,2
H16	3,5	8	13	9	10	2	5,5	5	7	5,8	3	9,5	6	7	7,5
H17	4	11	9	9	9,7	8	7	4,5	5	5,5	6	7,5	11	6,5	8,3
H24	3	0	6	1	2,3	5	2,5	4,5	1,5	2,8	1	5	6	9,5	6,8

\*Hasil diatas sudah dikurangi diameter paper disc 6 mm.

Keterangan = (+): kontrol positif, U<sub>1</sub>: ulangan ke-1, U<sub>2</sub>: ulangan ke-2, U<sub>3</sub>: ulangan ke-3, R(mm): rata-rata dalam satuan milimeter

Respon hambat untuk pertumbuhan bakteri *Pseudomonas sp.* menunjukkan bahwa seluruh isolat bakteri memiliki respon hambat katagori sedang. Nilai daya hambat yang paling tinggi terdapat pada isolat H4 dengan rata-rata diameter sekitar 9,5 mm.

Berdasarkan uji antagonistik, isolat H8 dan H12 merupakan isolat yang memiliki nilai hambat tertinggi terhadap ketiga bakteri patogen (*V. alginolyticus*, *A. hydrophila* dan *Pseudomonas sp.*) yang terbaik dengan rata-rata diameter sekitar 9,3 mm dengan katagori sedang. Kemampuan isolat bakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen merupakan bentuk aktivitas antagonis yang diduga dilakukan dengan menghasilkan kandungan senyawa yang bersifat antimikrobia. Menurut Romanengko *et al.* (2008), biosintesis senyawa antimikrobia berperan penting dalam proses pelekatan, kolonisasi target hingga kompetisi dalam mendapatkan ruang dan nutrisi dengan mikroba lain.

Perbedaan kemampuan daya hambat pada setiap isolat disebabkan oleh perbedaan kandungan metabolit sekunder yang dimiliki oleh masing masing isolat yang telah berdifusi terlebih dahulu ke

dalam agar, sehingga pertumbuhan bakteri patogen menjadi terhambat. Secara umum kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri lain dikarenakan oleh beberapa faktor seperti: produksi antibiotik, bakteriosin, siderphores, lisosom, protease dan hidrogen peroksida atau mempengaruhi pH media dengan menghasilkan asam organik tertentu. Hal ini sejalan dengan penelitian Lestari *et al.* (2016) bahwa agen bakteri seperti asam laktat yang dimiliki oleh bakteri probiotik mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen dikarenakan agen antibakteri mampu menurunkan pH menjadi rendah sehingga bakteri patogen sulit bertahan hidup.

#### Analisis Sekuens Bakteri Heterotrofik

Berdasarkan hasil analisis *BLAST* dengan merujuk pada *Gen Bank* melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> menunjukkan bahwa kesepuluh isolat memiliki nilai homologi sekitar 81-99% terhadap jenis bakteri yang terdapat di dalam database *Genbank* (Tabel 6).

Menurut Hagstrom *et al.* dalam Feliatra *et al.* (2011) menyatakan bahwa isolat yang mempunyai persamaan homologi lebih dari 97% dapat mewakili

pada tingkat spesies yang sama. Persamaan homologi antara 93% - 97% dapat mewakili identitas pada tingkat genus tetapi berbeda pada tingkat spesies, jika dibawah 93% kemungkinan spesies baru yang urutan basa nitrogennya belum masuk dalam database Genbank.

Isolat H2 memiliki nilai homologi sekitar 81% terhadap bakteri *Bacillus* sp. starin DP5 dan isolat H10 memiliki homologi sekitar 91% terhadap bakteri *Bacillus cereus* starin SN7. Ini berarti

melihat dari tingkat homologinya kemungkinan isolat H2 dan H10 merupakan spesies baru yang urutan basa nitrogennya belum masuk dalam database Genbank. Hal ini dikuatkan oleh Janda dan Abbott (2007) menyatakan jika homologi mempunyai persentase mendekati 100% atau diatas 97% dapat dikonfirmasi sebagai suatu spesies yang sama tetapi sebaliknya jika homologinya lebih kecil dari 97% kemungkinan isolat tersebut adalah spesies baru.

**Tabel 6. Hasil BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)**

Isolat	Spesies	Strain	Kode Akses	Referensi	Homologi (%)
H2	<i>Bacillus</i> sp.	DP5	KX453268.1	Korpole <i>et al.</i> (2016)	81%
H4	<i>Bacillus cereus</i>	BF2	JF322796.1	Huma dan Kalia (2011)	98%
H8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ALK320	KC456535.1	Fu dan He (2013)	99%
H9	<i>Bacillus cereus</i>	no31	KY819017.1	Shu (2017)	99%
H10	<i>Bacillus cereus</i>	SN7	KM489154.1	Nath (2014)	91%
H12	<i>Bacillus cereus</i>	LOCK 1002	KT728833.1	Pietrzak <i>et al.</i> (2016)	99%
H15	<i>Bacillus cereus</i>	SBABrB5	LC189361.1	Wijayanti <i>et al.</i> (2016)	98%
H16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S2QPS8	HQ844502.1	Ping (2011)	99%
H17	<i>Bacillus cereus</i>	DFT-5	KY750689.1	Feliatra <i>et al.</i> (2017)	99%
H24	<i>Bacillus cereus</i>	KES7	KP202304.1	Senthil (2015)	97%

Berdasarkan uji biokimia, isolat H2 dan H10 merupakan suatu bakteri dari genus *Bacillus* dengan karakteristik gram positif dan motil. Bentuk koloni bundar, tepian koloni licin, elevasi koloni datar sampai timbul atau cembung dan warna koloni putih atau putih kekuningan. Katalase positif, indol negatif, uji MR negatif.

Isolat H4 memiliki homologi 98% terhadap bakteri *B. cereus* starin BF2, H9 memiliki homologi 99% terhadap terhadap bakteri *B. cereus* starin no31, H12 memiliki homologi 99% terhadap bakteri *B. cereus* starin LOCK 1002, H15 memiliki homologi 98% terhadap bakteri *B. cereus* starin SBABrB5, H17 memiliki homologi 99% terhadap bakteri *B. cereus* starin DFT-5, dan H24 memiliki homologi 97% terhadap

bakteri *B. cereus* starin KES7. Keenam isolat tersebut menunjukkan persentase homologi  $\geq 97\%$  yang berarti memiliki kekerabatan sampai tingkat spesies terhadap bakteri *B. cereus*.

*B. cereus* adalah bakteri pembentuk spora yang tergolong kedalam famili Bacillaceae. Spora *B. cereus* tahan terhadap panas dan radiasi. Bakteri ini bersifat aerobik sampai anaerobik fakultatif, katalase positif dan merupakan bakteri gram positif berbentuk batang. *B. cereus* termasuk salah satu organisme mesofilik. Menurut Susana (2017) membuktikan bahwa bakteri *B. cereus* mampu menghasilkan senyawa antimikroba dan dapat menghambat bakteri patogen yaitu *V. alginolyticus*, *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. yang ditandai dengan

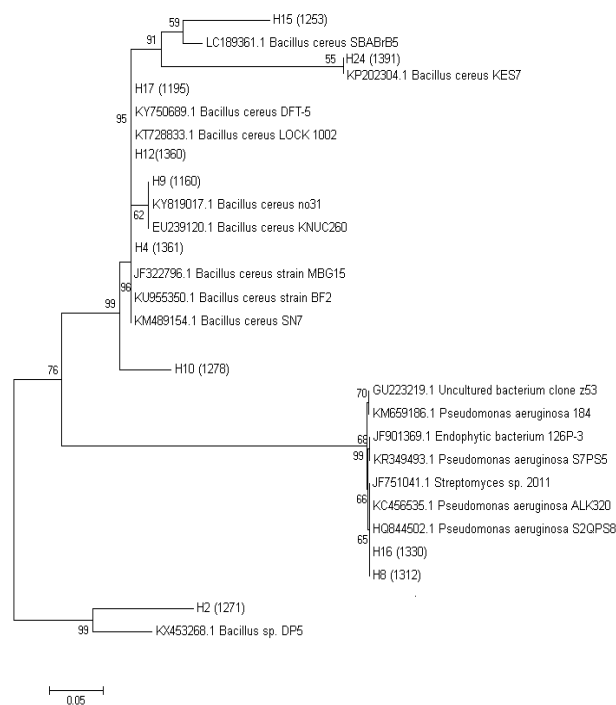
terbentuknya zona bening pada saat uji antagonistik.

Kemampuan ini diduga karena bakteri dari jenis ini menghasilkan senyawa antibiotik. Senyawa antibiotik merupakan kumpulan zat-zat kimia yang diproduksi oleh mikroorganisme diantaranya oleh fungi dan bakteri yang memiliki fungsi menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme lain. Nishijima *et al.* (2005) mengatakan bahwa spesies *Bacillus* menghasilkan sedikitnya 66 jenis antibiotik.

Bakteri ini juga sering dipakai dalam penelitian yang berkaitan dengan probiotik. Secara umum peran probiotik di lingkungan perairan diantaranya mempertahankan keseimbangan pH pada siang dan malam hari, mempercepat proses penguraian limbah serta mengeliminasi gas-gas beracun. Menurut Umoro (2016) bahwa bakteri *B. cereus* digunakan sebagai probiotik pada budidaya perikanan yang diambil dari saluran pencernaan karena bakteri ini memiliki zat antimikroba yang disebut bakteriosin.

Menurut (Drieder *et al.*, 2006), bakteriosin merupakan senyawa antimikroba polipeptida yang disintesis di ribosom oleh bakteri gram positif atau gram negatif. Bakteriosin bukan bahan toksik, tetapi senyawa protein yang didegradasi enzim proteolitik. bakteriosin bersifat stabil terhadap pH dan suhu yang cukup luas. Umoro (2016) menyatakan bahwa Senyawa bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri berbeda-beda pada setiap jenis bakteri. Pada bakteri jenis *B. cereus* senyawa bakteriosin yang dihasilkan yaitu Cerein GN105, Cerein 7A dan Cerein 7B.

Habitat utama *B. cereus* adalah lingkungan dan saluran pencernaan. Terutama tanah dan air. Bakteri ini dapat menempel pada sepatu, pakaian, kulit pekerja serta dapat melalui udara ataupun debu. Panunjang *et al.* (2015) menyatakan bakteri dari jenis ini tidak hanya dijumpai di tanah, air, makanan fermentasi tetapi juga ditemukan di perairan pantai.



Gambar 3. Pohon Filogenetik kesepuluh Isolat

Isolat H8 dan H16 mempunyai kemiripan homologi 99% dengan bakteri *P. aeruginosa* strain ALK320 dan *P. aeruginosa* strain S2QPS8. Ini berarti tingkat homologinya sama sampai tingkat spesies. Hal ini didukung dengan uji biokimia yang menunjukkan bahwa isolat H16 bersifat gram negatif, katalase positif, bersifat motil, dan tidak mampu memfermentasi gula. Pernyataan tersebut sejalan dengan pendapat Suyono dan Salahudin (2011) bahwa bakteri *Pseudomonas* sendiri memiliki karakteristik seperti gram negatif, berbentuk batang (*rods*) atau kokus (*coccus*), aerob obligat, motil mempunyai flagel polar. Bakteri ini, oksidase positif, katalase positif dan *nonfermenter*.

*P. aeruginosa* sering diidentifikasi dengan bakteri patogen karena dalam beberapa kasus bakteri ini dapat menyebabkan penyakit terhadap inangnya. Berdasarkan sifatnya tersebut banyak dari bakteri ini digunakan dalam bidang pertanian untuk dimanfaatkan sebagai agen pengendali penyakit tanaman. Menurut Mansoor *et al.* (2007), berdasarkan uji *in vitro* aplikasi *P. aeruginosa* dapat menghambat pertumbuhan *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* dan *Fusarium oxysporum* dengan menghasilkan zona penghambatan secara berturut-turut 2, 6, dan 10 mm. Hal ini menjelaskan bahwa bakteri *P. aeruginosa* memiliki sifat antibakteri terhadap mikroba tertentu.

Pernyataan tersebut dikuatkan oleh penelitian Yasmin *et al.* (2014) yang menyatakan *P. aeruginosa* Z5 secara signifikan mengurangi kejadian penyakit dengan menekan pertumbuhan *F. oxysporum* (agen penyebab penyakit bibit kapas). Selain itu, menurut Azadeh dan Meon (2009) *P. aeruginosa* strain UPM P3 berpotensi menekan patogen *Ganoderma boninense*, penyebab penyakit busuk batang

*Basal Stem Rot* (BSR) pada kelapa sawit. *P. aeruginosa* juga memproduksi pyoverdinin dan asam salisilat yang efektif melawan *Paenonospora tabacina* pada pertanaman tembakau, *Alternaria solani* pada tomat, *Pseudoperonospora cubensis* pada mentimun (Fallahzadeh *et al.*, 2010).

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan didapatkan 10 isolat bakteri murni (H2, H4, H8, H9, H10, H12, H15, H16, H17, dan H24) mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen (*Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp.). Isolat H8 dan H12 merupakan isolat terbaik yang mampu menghambat pertumbuhan ketiga bakteri patogen dengan rata-rata diameter sekitar 9,3 mm dan masuk dalam katagori daya hambat yang sedang. Hasil identifikasi dengan menggunakan analisis 16S rDNA diketahui bahwa 10 isolat teridentifikasi termasuk bakteri *Bacillus* sp., *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan tingkat homologi berkisar 81-99%. Berdasarkan hasil uji regresi linear sederhana menunjukkan hubungan antara jumlah bakteri heterotrofik dengan parameter lingkungan yang diukur dalam katagori lemah ( $r = 0,26$ ).

### Saran

Pada penelitian selanjutnya disarankan untuk melanjutkan tentang senyawa metabolit primer dan sekunder yang dihasilkan dari kesepuluh bakteri tersebut sehingga dapat diaplikasikan dan dimanfaatkan dalam bidang bioteknologi dan farmasi. Selain itu perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap isolat H2 dan H10 yang teridentifikasi termasuk bakteri spesies baru.

## DAFTAR PUSTAKA

- Azadeh, B. F and S. Meon. 2009. Molecular Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* UPM P3 from Oil Palm Rhizosphere. *American Journal of Applied Sciences*. Vol 6 (11): 1915-1919.
- Drider D, G. Fimland, Y. Hechard, M. McMullen, H. Prevost. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev*. 70(2):564-582.
- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan I. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Fallahzadeh, V. M. Ahmadzadeh, and R. Sharifi. 2010. Growth and pyoverdine production kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 in an experimental fermentor. *Journal of Agricultural Technology*. Vol.6(1):107-115.
- Feliatra, F. T.Nogroho, T. Silalahi, S. Y. Octavia. 2011. Skrining Bakteri *Vibrio* Sp Asli Indonesia sebagai Penyebab Penyakit Udang Berbasis Teknik 16s Ribosomal Dna. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautam Tropis*. Vol 3 (2): 85-99.
- Feliatra, Y. Fitria, dan Nursyirwani. 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.
- Janda J. M, dan S. M. Abbott. 2007. 16s *rRNA* Gene Sequencing for Bacterial Identification In the Diagnostic Laboratory: Pulses, Perils, and Pitfalls. *J.Clin Microbial*. 30: 3217-3219.
- Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup. 2004. Baku Mutu Air Laut untuk Biota Laut. No. 51.
- Lestari, N. W., A. Budiharjo, A. Pangastuti. 2016. Bakteri Heterotrof Aerobik Asal Saluran Pencernaan Ikan Sidat (*Anguilla bicolor*) dan Potensinya sebagai Probiotik. *Bioteknologi*. Vol 13(1) : 9-17.
- Mansoor, F., V. Sultana, and S. E. Haque. 2007. Enhancement of biocontrol potential of *Pseudomonas aeruginosa* and *Paecilomyces lilacinus* against root rot of mungbean by a medicinal plant *Launaea nudicaulis* L. *Pak. J. Bot*. 39, 2113-2119.
- Nishijima, T., K. Toyota, and M. Mochizuki. 2005. Predominant culturable *Bacillus* species in Japanese arable soils and their potential as biocontrol agents. *Microbes and Environments* 20 (1): 61-68.
- Pananjung, A. M. S. Ulfa, E. U. Senjarini, K. Arimurti, S. 2015. Karakterisasi Isolat Bakteri Fibrinolitik Wu 021055 Asal Perairan Pantai Papuma, Jember. *J. Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. Vol 2 (1): 1-8.
- Romanengko, L.A., Naoto, T., Masataka, U., Natalia, I.K., Valery, V.M., 2008. Diversity and antagonistic activity of sea ice bacteria isolated from the sea of Japan. *Microbiol. Environ.*, 23: 209-214.
- Sari, D. M. 2017. Isolasi Bakteri Heterotrofik pada Sedimen di Perairan Tanjung Medang Kecamatan Rupa Utara Provinsi Riau dan Aktivitasnya terhadap Bakteri Patogen. *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Souhoka, J dan S. I. Patty. 2013. Pemantauan Kondisi Hidrologi dalam Kaitannya dengan Kondisi Terumbu Karang Di Perairan Pulau Talise, Sulawesi Utara. *J. Ilmiah Platax*. Vol (1)3: 138-147.

- Susana, M. 2017. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Heterotrofik pada Perairan Laut Kawasan Pemukiman dan Perairan Bersalinitas Rendah Di Kelurahan Purnama Dumai Provinsi Riau, *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Suyono, Y. dan F. Salahudin. 2011. Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri *Pseudomonas* pada Tanah yang Terindikasi Terkontaminasi Logam. *Jurnal BIOPROPAL INDUSTRI*. Vol 2(1): 8-13.
- Tanjung, A. 2014. Rancangan Percobaan. TANTARAMESTA Asosiasi Direktorat Indonesia. Bandung.
- Umoro, A. 2016. Isolasi *Bacillus* Sp. Penghasil Bakteriosin dan Peningkatan Aktivasnya sebagai Penghambat *Vibrio harveyi*. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Yasmin, S., F. Hafeez, B. Rasul. 2014. Evaluasi *P. saeruginosa* Z5 untuk biokontrol penyakit kapas bibit yang disebabkan oleh *Fusarium oxysporum*. *J. Biokontrolsains dan teknologi*. Vol 24 (11).