

Kluster Gen Biosintetik (NRPS/PKS) Pada Bakteri Sedimen Mangrove Pantai Tirang Semarang Indonesia

Barra Muzaffar Widayat, Delianis Pringgenies, Wilis Ari Setyati*

Departmen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Jacob Rais, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah, 50275, Indonesia
Email: wilisarisetiyati@yahoo.co.id

Abstract

Biosynthetic Gene Clusters and Antibacterial Activity in Mangrove Sediment Bacteria at Tirang Beach

This study aims to explore biosynthetic gene clusters and antibacterial activity in mangrove sediment bacteria at Tirang Beach, Semarang, Central Java. Research methods include isolating bacteria from seagrass sediments, antibacterial testing against *S. aureus* and *E. coli* bacteria, identifying bacteria using the DNA method, and testing the presence of biosynthetic gene clusters. The results showed that the mangrove sediment bacterial isolate with the isolate code B.26.ST.3.4 had the highest antibacterial activity with a value of 28.05 ± 0.9192 against the pathogen *E. coli* and 23.45 ± 10.2530 against the pathogen *S. aureus*. Apart from that, there are two other isolates that also have antibacterial activity. Based on bacterial DNA identification, mangrove sediment bacteria that have potential as antibacterials are *Bacillus velezensis* (B.9.ST.1.4), *Bacillus subtilis* (B.13.ST.2.2), and *Bacillus amyloliquefaciens* (B.26.ST.3.4). These three isolates have the NRPS gene, and isolate B.9.ST.1.4 also has the PKS-II gene, while isolate B.26.ST.3.4 has the PKS-I gene. This discovery provides a deeper understanding of the antibacterial potential of mangrove sediment bacteria at Tirang Beach, Semarang. This information can be used to develop natural antibiotics that are more effective and have the potential to fight bacterial infections that are increasingly resistant to conventional antibiotics. The conclusion is that bacteria have potential as antibacterials from mangrove sediment bacteria at Tirang Beach, Semarang through isolation and identification of bacteria. Isolate B.26.ST.3.4 has the highest antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* pathogens. Apart from that, *Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus amyloliquefaciens* also have antibacterial potential. The NRPS gene was found in all three isolates, while isolate B.9.ST.1.4 also had the PKS-II gene and isolate B.26.ST.3.4 had the PKS-I gene. This discovery can provide a deeper understanding of the natural antibiotic potential of mangrove sediment bacteria and can be the basis for further development in the pharmaceutical field.

Keywords: Bacteria Identification, Gene, NRPS, PKS, Sediments

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi kluster gen biosintesis dan aktivitas antibakteri pada bakteri sedimen mangrove di Pantai Tirang, Semarang, Jawa Tengah. Metode penelitian meliputi isolasi bakteri dari sedimen lamun, uji antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*, identifikasi bakteri dengan metode DNA, dan uji keberadaan kluster gen biosintesis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri sedimen mangrove dengan kode isolat B.26.ST.3.4 memiliki aktivitas antibakteri tertinggi dengan nilai $28,05 \pm 0,9192$ terhadap patogen *E. coli* dan $23,45 \pm 10,2530$ terhadap patogen *S. aureus*. Selain itu, terdapat dua isolat lain yang juga memiliki aktivitas antibakteri. Berdasarkan identifikasi bakteri DNA, bakteri sedimen mangrove yang potensial sebagai antibakteri adalah *Bacillus velezensis* (B.9.ST.1.4), *Bacillus subtilis* (B.13.ST.2.2), dan *Bacillus amyloliquefaciens* (B.26.ST.3.4). Ketiga isolat ini memiliki gen NRPS, dan isolat B.9.ST.1.4 juga memiliki gen PKS-II, sedangkan isolat B.26.ST.3.4 memiliki gen PKS-I. Penemuan ini memberikan pemahaman yang lebih dalam tentang potensi antibakteri dari bakteri sedimen mangrove di Pantai Tirang Semarang. Informasi ini dapat digunakan untuk mengembangkan antibiotik alami yang lebih efektif dan memiliki potensi dalam melawan infeksi bakteri yang semakin resisten terhadap antibiotik konvensional. Kesimpulan bahwa bakteri memiliki potensi sebagai antibakteri dari bakteri sedimen mangrove di Pantai Tirang, Semarang melalui isolasi dan identifikasi bakteri. Isolat B.26.ST.3.4 memiliki aktivitas antibakteri tertinggi terhadap patogen *E. coli* dan *S. aureus*. Selain itu, *Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis*, dan *Bacillus amyloliquefaciens* juga memiliki potensi sebagai antibakteri. Gen NRPS ditemukan pada ketiga isolat tersebut, sedangkan isolat B.9.ST.1.4 juga memiliki gen PKS-II dan isolat B.26.ST.3.4 memiliki gen PKS-I. Penemuan ini dapat memberikan pemahaman yang lebih dalam tentang potensi antibiotik alami dari bakteri sedimen mangrove dan dapat menjadi dasar untuk pengembangan lebih lanjut dalam bidang farmasi.

Kata kunci : Gene, Identifikasi Bakteri, Gene, NRPS, PKS, Sediments

PENDAHULUAN

Mangrove sebagai ekosistem pesisir yang kaya keanekaragaman hayati, menjadi tempat tinggal bagi berbagai makhluk hidup termasuk mikroorganisme seperti bakteri. Pringgenies *et al.*

(2021), menyatakan bahwa bakteri yang ada di dalam sedimen mangrove memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa-senyawanya sendiri, yang dapat berkhasiat sebagai antibakteri. Bakteri sedimen mangrove telah menarik perhatian peneliti di bidang mikrobiologi karena potensinya dalam aktivitas antibakteri. Selain memiliki aktivitas antibakteri, bakteri ini juga memproduksi enzim protease yang berperan penting dalam proses degradasi protein dan degradasi bakteri patogen (Luo *et al.*, 2015; Zebula *et al.*, 2020; Begum *et al.*, 2020; Anggelina *et al.*, 2021).

Penelitian ini memiliki fokus lain yakni merujuk pada klaster gen yang terlibat dalam biosintesis bakteri yang ada di lingkungan sedimen mangrove. Klaster atau rangkaian gen biosintesis adalah sekumpulan gen yang terlibat dalam pembuatan senyawa biologis seperti antibiotik, enzim, pigmen, dan berbagai jenis senyawa aktif lainnya. Penelitian mengenai klaster gen ini penting dalam rangka memberikan wawasan baru tentang kemungkinan adanya antibiotik alami yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut (Escalante-Réndiz, 2019; Kramer *et al.*, 2023). Dengan meningkatnya resistensi bakteri terhadap antibiotik yang saat ini tersedia, penemuan dan pengembangan antibiotik alami dari sumber mikroorganisme seperti bakteri sedimen mangrove menjadi penting. Penelitian ini dapat memberikan kontribusi dalam upaya meningkatkan pengetahuan tentang potensi bakteri sedimen mangrove sebagai sumber antibakteri alami dan memperluas pemahaman tentang klaster gen biosintesis yang dimiliki oleh bakteri sedimen mangrove.

Tujuan utama dari adanya penelitian ini adalah mengetahui aktivitas antibakteri dari isolat bakteri sedimen mangrove yang dideskripsikan secara kuantitatif; mengidentifikasi jenis bakteri sedimen mangrove yang berpotensi mengandung zat antibakteri; dan mengidentifikasi jenis klaster gen biosintesis yang dimiliki oleh isolat bakteri sedimen mangrove. Informasi yang diperoleh dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemahaman lebih mendalam tentang potensi antibakteri dari bakteri sedimen mangrove serta kemungkinan mengaplikasikannya dalam pengembangan antibiotik alami. Selain itu, penelitian ini juga diharapkan mampu memberikan suatu kontribusi penting dalam upaya pelestarian dan pengelolaan ekosistem mangrove sebagai sumber daya alam yang potensial untuk menghasilkan senyawa bioaktif.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan bakteri hasil isolasi dari sampel sedimen mangrove yang diambil dari perairan Pantai Tirang, Semarang, Jawa Tengah. Sampel sedimen diambil dari 3 stasiun berbeda yang kemudian di bawa ke laboratorium tropical marine biotechnology, gedung J, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro.

Pembuatan media kultur bakteri sedimen dilakukan dengan melakukan penimbangan komponen media semi padat Zobell Marine Agar 2216 E (ZMA) Zebua *et al.* (2020), yaitu sebanyak 5 gram Peptone, 1 gram Yeast extract, dan 15 gram Agar bacteriological. Sedangkan komponen media cair Zobell Marine, yaitu 5 gram Peptone, 1 gram Yeast extract. Komponen-komponen ini kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan diencerkan dengan campuran air laut sebanyak 70% dan akuades sebanyak 30% hingga mencapai volume 1L. Proses selanjutnya melibatkan penutupan erlenmeyer menggunakan aluminium foil dan plastik, diikuti dengan homogenisasi menggunakan hot plate magnetic stirrer. Media yang telah homogen tersebut kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Prosedur pembuatan media untuk kultur bakteri patogen dan uji aktivitas antibakteri memiliki kesamaan dengan media sebelumnya. Pada tahap ini, dilakukan penimbangan media Nutrient Agar (NA) (HIMEDIA®) sebanyak 28 gram dan Mueller–Hinton agar (MHA) (HIMEDIA®) sebanyak 36 gram menggunakan timbangan analitik. Subsequently, masing-masing media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan diencerkan dengan akuades hingga mencapai volume 1L. Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan aluminium foil dan plastik sebelum di homogenisasi dengan hot plate magnetic stirrer. Setelah homogen, media disubjekkan pada proses sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Preparasi sampel dilakukan di Laboratorium Tropical Marine Biotechnology, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro dengan metode serial delution atau pengenceran bertingkat. Sebanyak 15 tabung reaksi diisi dengan masing-masing 9 ml air campuran (70% air laut, 30% akuades) kemudian disterilkan terlebih dahulu menggunakan autoklaf suhu 121° C selama 15 menit. Sampel air disiapkan dan berperan sebagai pengenceran. Sebanyak 1 gram sampel air diambil menggunakan spatula steril, kemudian dipindahkan ke tabung reaksi berisi 9 ml air campuran untuk memperoleh pengenceran 10⁻¹. Tabung reaksi kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Pengenceran selanjutnya dilakukan dengan menambahkan 1 ml hasil pengenceran sebelumnya ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml air campuran steril. Pengenceran dilakukan sebanyak 5 kali hingga diperoleh pengenceran 10⁻⁴ (Begum, *et al.*, 2020).

Isolasi bakteri sedimen mangrove dilakukan dengan menggunakan metode pour plate Putri, *et al.* (2020) dengan modifikasi. Sebelum diisolasikan pada media agar, sebanyak 200µl hasil pengenceran 10⁻³ dan 10⁻⁴ ditambahkan ke cawan petri steril. Media Zobell Marine Agar 2216 E steril ditambahkan ke dalam cawan petri berisi hasil pengenceran pada suhu berkisar 45°C. Cawan petri digerakkan menyerupai angka delapan agar homogen kemudian didiamkan hingga media agar memadat. Pengulangan perlakuan dilakukan sebanyak dua kali. Cawan petri hasil isolasi diinkubasi pada suhu 37° C.

Karakterisasi koloni bakteri kemudian dilakukan dengan metode acuan Pranaya, *et al.* (2020) untuk mengidentifikasi dan memahami ciri-ciri morfologi seperti bentuk, warna, elevasi, margin, ukuran, dan tekstur yang dimiliki oleh masing-masing koloni. Pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan metode Maulidiyah, *et al.* (2020) menggunakan strik 4 kuadran untuk memastikan kemurnian dan representatives sampel bakteri yang diisolasi. Koloni yang menunjukkan morfologi berbeda pada cawan petri diambil menggunakan ose bulat dan digoreskan ke media ISP2 pada cawan petri baru yang sebelumnya telah disiapkan. Kemudian di inkubasi pada suhu ruang optimal yaitu 25–37°C.

Pembuatan standar McFarland dibuat dengan mencampurkan larutan BaCl₂ 1% dan H₂SO₄ 1% dengan volume tertentu (Jangla, *et al.*, 2021). Sebanyak 1 g BaCl₂ dilarutkan dalam 100 ml akuades di dalam labu ukur, larutan dihomogenkan. Sebanyak 1 ml H₂SO₄ pekat di pipet ke dalam labu ukur volume 100 ml berisi kurang lebih 50 ml akuades. Akuades ditambahkan ke dalam labu ukur hingga mencapai tanda batas. Standar McFarland 0,5, 1, 2, 3, dan 4 dibuat dengan memipetkan BaCl₂ 1% dan H₂SO₄ 1% ke dalam tabung ulir dengan volume. Skrining dilakukan sebagai uji pendahuluan aktivitas bakteri agar dapat memperoleh isolat yang diduga akan berpotensi aktif untuk melawan jamur patogen. Skrining yang memiliki aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode agar plug berdasarkan Ayuningrum *et al.* (2019) dengan beberapa modifikasi. Kultur bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan menggunakan nutrisi agar, dengan proses pengkulturan yang dilakukan setiap interval tujuh hari untuk memantau pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme tersebut. Bakteri patogen yang sudah berusia 1x24 jam diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi media nutrient agar dan selanjutnya di centrifuge dan nilai kekeruhannya dicocokkan dengan standar McFarland 0,5 atau 1 x 10⁸ CFU/ml (Kristiana *et al.*, 2019). Bakteri patogen yang selanjutnya diinokulasikan menggunakan cotton swab yang sudah steril secara merata ke media nutrient agar. Kultur isolat bakteri yang sudah diinkubasi dipotong berbentuk silindris dengan diameter 8 mm menggunakan pangkal blue tip dan ditempelkan pada permukaan media yang sebelumnya telah diinokulasikan dengan bakteri uji. Sampel uji diinkubasi pada suhu 29–34°C. Pengamatan dan pengukuran zona hambat dilakukan saat sampel telah diinkubasi selama 3x24 jam. Hasil uji dilihat dari keberadaan zona bening disekitar media agar yang berisi isolat bakteri.

Uji gram bakteri dilakukan dengan mengoleskan isolat bakteri murni ke kaca preparat kemudian difiksasi dengan api bunsen. Selanjutnya, kaca preparat ditetesi pewarna crystal violet dan didiamkan selama 1 menit. Kaca preparat kemudian ditetesi larutan iodine selama 1 menit lalu dibilas dengan air mengalir. Isolat kemudian ditetesi dengan gram decoloration dan didiamkan

selama 30 detik. Kaca preparat dibilas dengan air mengalir lalu dikeringkan. Lalu, kaca preparat ditetaskan dengan dengan safranin selama 30 detik dan dibilas dengan air mengalir kemudian didiamkan hingga kering. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dan pembesaran lensa 100x. Bakteri gram positif ditandai dengan tampak warna biru dan bakteri gram negatif ditandai dengan tampak warna merah (Li *et al.*, 2020).

Isolasi DNA dari isolat bakteri air limbah tambak udang dilakukan menggunakan Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit dalam (Nurliana *et al.*, 2022). Kultur isolat (1×10^9 sel/mL) sebanyak 1.5ml disentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Pelet dimasukan ke dalam microtube berisis Buffer GT (200 μ L) dan lisozim (0,8 mg/mL), homogenkan selama 1 menit, Proteinase K (20 μ L) ditambahkan, Microtube diletakan pada heating block selama 10 menit dengan suhu 60°C. Sampel kemudian dihomogenkan selama 10 detik, dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit. Etanol absolut (200 μ L) ditambahkan ke dalam microtube oleh homogenisasi. Sampel kemudian dimasukan ke dalam kolom GD kemudian diputar selama 2 menit pada kecepatan 14.000 rpm. Kemudian, kolom GD dipindahkan ke dalam microtube 2 mL yang baru kemudian ditambahkan buffer W1 (400 μ L) lalu disentrifugasi selama 3 menit. Kemudian Washing Buffer (600 μ L) dan campuran etanol ditambahkan, setelah itu larutan disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit dan supernatan dibuang. Kolom GD dipindahkan ke dalam microtube 2 mL yang baru, dan buffer elusi (30 μ L) ditambahkan (sebelumnya dipanaskan pada suhu 70°C). Kemudian larutan diinkubasi pada suhu 27-29°C selama 5 menit lalu disentrifugasi pada kecepatan 16.000 rpm selama 1 menit. Microtube DNA template disimpan pada suhu -20°C.

Metode PCR yang digunakan mengacu pada penelitian Anggelina *et al.* (2021). Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan mencampurkan 1 μ L DNA template, pasangan primer 27F (5'-AGAGTTGATCCTGGTCAG-3') dan 1429R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (El Samak *et al.*, 2018) , masing-masing 1 μ L pada konsentrasi 10 mM, 12,5 μ L Thermo Scientific 2X Phire Plant Direct PCR Master Mix, dan 9,5 μ L ddH₂O. Proses PCR dilakukan sebanyak 40 siklus dengan tahapan sebagai berikut: denaturasi awal (98°C, 5 menit), denaturasi (98°C, 5 detik), annealing (55°C, 5 detik), ekstensi (72°C, 1 menit), dan ekstensi akhir (72°C, 1 menit). Deteksi cluster gen NRPS dilakukan dengan pasangan primer A2gam F (5'-AAGGCNGGCGSBGCSTAYSTGCC-3') dan A3gamR (5'-TTGGGBIKCCGGTS GINCCSGAGGTG-3'). Deteksi kluster gen PKS tipe I dengan pasangan primer MDPQQR f (5'-RTRGAYCCNCAGCAICG-3') dan HGTGT r (5'-VGTNCCNGTGCCRTG-3'). Deteksi kluster gen PKS-II dilakukan dengan mencampurkan pasangan primer PF6 (5'-TSGCSTGCTTGGAYGCSATC-3') dan PR6 (5'TGGAANCCGCCGAABCCGCT-3'). Setiap pasang primer diperlukan sebanyak 1 μ L, kemudian dicampurkan dengan Thermo Scientific 2X Phire Plant Direct PCR Master Mix (10 μ L), 8 μ L ddH₂O dan 1 μ L DNA *template*. Amplifikasi PCR dilakukan sebanyak 40 siklus dengan tahapan sebagai berikut: tahap awal pra-denaturasi pada suhu 98°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan denaturasi pada suhu 98°C selama 5 detik, anil pada suhu 70°C selama 5 detik, detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit, dan tahap penutup pasca ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit.

Elektroforesis sampel DNA klastergen menggunakan protokol Kramer *et al.* (2023) dilakukan dalam media gel agarosa. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan pada penelitian ini adalah gel agarosa 1% dalam larutan buffer TBE (Tris Borate EDTA) yang dicampur dengan pewarna GelRed agar lebih mudah divisualisasikan dengan sinar UV. Proses elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt dan kuat arus 400 A selama 30 menit. Kemudian gel agarosa dipindahkan ke UVIDoc HD5 (UVITEC Cambridge, UK) untuk memproses visualisasi pita DNA yang terbentuk.

Data aktivitas antibakteri diolah menggunakan Microsoft Excel, dengan analisis statistik termasuk perhitungan standar deviasi. Sekuens DNA dari PT. Genetika Science disekuensing dan diolah menggunakan MEGA 11 untuk membuat BLAST Homology, mengikuti metode Ayuningrum *et al.* (2021). Hasilnya, dalam format FASTA, dibandingkan dan dicocokkan dengan database GenBank melalui program BLAST di situs NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) seperti yang diakui oleh (Atschul *et al.*, 1997; Kristiana *et al.*, 2019). Langkah berikutnya adalah mencocokkan hasil dengan spesies bakteri melalui BLAST online, dan sekuens bakteri yang paling serupa disejajarkan menggunakan ClustalW (Sabdaningsih *et al.*, 2019).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengambilan sampel sedimen dilakukan dengan menggunakan sekop yang ditusukan ke dalam sedimen dengan kedalaman 0-10 cm. Pengambilan sampel dilakukan di badan air yang ditumbuhi oleh mangrove. Perbedaan parameter dalam pengambilan sampel tersebut dikarenakan ingin mengetahui kondisi di setiap stasiun. Kehidupan bakteri dipengaruhi oleh parameter, antara lain suhu dan pH. Kebanyakan bakteri tumbuh paling baik pada pH netral (± 7) dan kisaran suhu 20-45°C (Yang, *et al.*, 2018). Namun, beberapa bakteri dapat tumbuh dalam kondisi ekstrim, seperti lingkungan asam atau basa, dan suhu tinggi atau rendah. Suhu mempengaruhi laju reaksi kimia pada bakteri, dan suhu ekstrim dapat mengubah sifat protein dan makromolekul lainnya, yang menyebabkan kematian sel (Hošťacká, *et al.*, 2010). pH mempengaruhi muatan biomolekul dan aktivitas enzim, yang penting untuk metabolisme bakteri. PH ekstrim juga dapat mengganggu struktur makromolekul sehingga menyebabkan kematian sel (Moon *et al.*, 2023).

Hasil isolasi bakteri sedimen mangrove memperlihatkan ada 26 isolat dan hanya 3 isolat yang memiliki aktifitas antibakteri terhadap bakteri patogen *S. aureus* dan *E. coli* seperti yang terlihat pada Tabel. 1. Isolasi bakteri sedimen mangrove dilakukan setelah preparasi sampel dengan metode serial delution atau pengenceran bertingkat Begum *et al.* (2020) dengan modifikasi. Metode pengenceran ini dilakukan untuk mendapatkan koloni bakteri yang terpisah dan jumlahnya yang lebih sedikit. Isolasi bakteri sedimen mangrove dilakukan dengan menggunakan metode pour plate Putri *et al.* (2020), sebanyak 200 μ l hasil pengenceran 10⁻³ dan 10⁻⁴ ditambahkan ke cawan petri steril. Media Zobell Marine Agar 2216 E steril ditambahkan ke dalam cawan petri berisi hasil pengenceran pada suhu berkisar 45°C. Media Zobell Marine Agar 2216 E digunakan karena memiliki nutrisi yang dinilai sehingga cocok digunakan untuk menumbuhkan berbagai macam bakteri laut dengan karakteristik yang berbeda (Setiyorini *et al.*, 2023). Penggunaan suhu yang berkisar 45°C bertujuan untuk menghindari kematian bakteri yang disebabkan oleh suhu terlalu tinggi, selain itu bakteri untuk menghindari media supaya tidak mengagar karena suhu yang rendah. Cawan petri hasil isolasi diinkubasi pada suhu 37° C. Setelah 2x24 jam pengamatan koloni bakteri yang tumbuh. Jumlah koloni yang didapatkan dari 3 stasiun adalah 564 koloni yang terbagi menjadi 132 koloni dari stasiun 1, 338 koloni dari stasiun 2 dan 94 koloni dari stasiun 3. Perbedaan jumlah koloni dapat diakibatkan oleh adanya perbedaan parameter lingkungan.

Total sebanyak 26 isolat didapatkan dari isolasi tiga sampel sediment pantai tirang pada media ISP2 agar dan Zobell Marine agar. Sebanyak 7 isolat berasal dari sampel sedimen stasiun 1 dengan kode isolat ST.1, sedangkan dari stasiun 2 didapatkan total 12 isolat dengan kode ST.2, kemudian untuk stasiun 3 didapatkan sebanyak 6 isolat. Karakterisasi morfologi dari tiap isolate disajikan pada Tabel 1.

Total 26 isolat bakteri didapatkan dari hasil purifikasi. Sebagian besar isolat yang diperoleh memiliki bentuk irregular, elevasi convex hingga flat, warna putih dan krem, margin lobate, ukuran small, dan tekstur smooth. Namun, didapatkan pula isolat dengan karakteristik morfologi beragam sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 4.1. Karakterisasi morfologi merupakan salah satu langkah awal dalam mengidentifikasi bakteri. Koloni bakteri yang telah tumbuh pada cawan petri hasil isolasi dibedakan berdasarkan bentuk, elevasi, warna, margin, ukuran, dan tekstur. Koloni yang memiliki karakteristik morfologi berbeda kemudian dipurifikasi untuk mendapatkan isolat murni. Teknik purifikasi berdasarkan karakteristik morfologi ini didukung pula oleh Setiyorini *et al.* (2023), yang menggunakan metode serupa dalam penelitiannya.

Media merupakan faktor utama yang mempengaruhi karakter morfologi bakteri. Penelitian ini menggunakan media Zobell Marine Agar sebagai media pertumbuhan bakteri. Zobell Marine Agar dipilih karena merupakan media universal yang umum digunakan untuk menumbuhkan bakteri asal laut. Hal ini sesuai dengan penelitian Nursyahid *et al.* (2022), yang melaporkan bahwa media Zobell Marine Agar merupakan media dengan kandungan nutrisi sesuai untuk menumbuhkan bakteri yang

hidup di air bersalinitas. Penggunaan air campuran dalam pembuatan media ZMA dilakukan untuk menciptakan lingkungan yang mirip dengan lingkungan asal bakteri. Karakterisasi morfologi isolat merupakan tahapan awal dalam identifikasi bakteri di level makroskopis. Uji lanjutan seperti pewarnaan gram dan identifikasi molekuler diperlukan untuk mengetahui jenis bakteri secara lebih akurat.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan ke seluruh isolat untuk melawan patogen. Hasil uji dikatakan positif apabila terbentuknya daerah zona bening disekitar agar. Total ada 3 isolat yang memiliki nilai rata-rata zona bening terluas dan terjadi aktivitas antibakteri dari ke dua patogen. Kode tiga isolat tersebut adalah B.9.ST.1.4; B.13.ST.2.2; dan B.26.ST.3.4. Hasil uji aktivitas antibakteri melalui pengukuran zona bening dapat dilihat pada Tabel 2.

Zona bening yang diamati pada 72 jam menunjukkan bahwa isolat B.26.ST.3.4 memiliki aktivitas tertinggi dengan nilai $28,05 \pm 0,9192$ terhadap patogen *E. coli* dan $23,45 \pm 10,2530$ terhadap patogen *S. aureus*. Isolat B.13.ST.2.2 memiliki aktivitas tertinggi dengan nilai $24,3 \pm 3,2527$ terhadap patogen *E. coli* dan $18,475 \pm 13,1168$ terhadap patogen *S. aureus*. Isolat B.9.ST.1.4 memiliki aktivitas tertinggi dengan nilai $14,95 \pm 2,3335$ terhadap patogen *E. coli* dan $11 \pm 2,1213$ terhadap patogen *S. aureus* (Gambar 1.).

Tabel .1. Karakterisasi isolat

Kode Isolat	Bentuk	Warna	Elevasi	Margin	Ukuran	Tekstur
B.1.ST1.3	Irregular	Krem	Convex	Lobate	Moderate	Smooth
B.2.ST1.3	Irregular	Putih	Convex	Lobate	Moderate	Smooth
B.3.ST1.3	Irregular	Putih	Convex	Serrate	Large	Smooth
B.4.ST1.3	Irregular	Putih	Flat	Lobate	Small	Smooth
B.5.ST1.4	Round	Putih	Convex	Serrate	Small	Dry
B.6.ST1.4	Round	Putih	Convex	Undulate	Small	Dry
B.7.ST2.2	Round	Putih	Convex	Serrate	Small	Dry
B.8.ST2.2	Irregular	Krem	Flat	Lobate	Moderate	Smooth
B.9.ST1.4	Irregular	Putih	Flat	Scalloped	Large	Smooth
B.10.ST2.2	Irregular	Putih	Umbonate	Lobate	Moderate	Smooth
B.11.ST2.2	Irregular	Putih	Umbonate	Undulate	Moderate	Smooth
B.12.ST2.2	Irregular	Putih Kekuningan	Convex	Scalloped	Large	Smooth
B.13.ST2.2	Round	Putih	Convex	Lobate	Large	Smooth
B.14.ST2.2	Irregular	Putih	Raised	Lobate	Small	Smooth
B.15.ST2.2	Round	Putih	Umbonate	Curled	Small	Smooth
B.16.ST2.3	Round	Putih	Convex	Scalloped	Small	Smooth
B.17.ST2.3	Irregular	Putih	Raised	Serrate	Small	Smooth
B.18.ST2.4	Irregular	Putih	Convex	Lobate	Small	Smooth
B.19.ST2.4	Irregular	Putih Kemerahan	Convex	Lobate	Small	Smooth
B.20.ST3.3	Irregular	Putih	Flat	Lobate	Large	Smooth
B.21.ST3.3	Irregular	Putih	Flat	Serrate	Small	Smooth
B.22.ST3.3	Irregular	Putih	Flat	Lobate	Large	Smooth
B.23.ST3.3	Irregular	Putih	Flat	Serrate	Small	Smooth
B.24.ST3.3	Round	Putih	Flat	Entire	Small	Smooth
B.25.ST3.4	Round	Putih	Flat	Entire	Small	Smooth
B.26.ST3.4	Round	Putih	Flat	Entire	Small	Smooth

Uji aktivitas antibakteri dilakukan ke seluruh isolat murini untuk melawan patogen yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Penggunaan 2 patogen tersebut didasarkan pada kemampuan kedua bakteri yang kuat untuk bertahan hidup dalam kondisi lingkungan yang ekstrim, seperti suhu yang sangat tinggi atau rendah, tekanan tinggi, dan lingkungan yang sangat asam atau basa. Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan bakteri patogen *S. aureus* dan *E. coli* supaya dapat membantu mengembangkan obat yang lebih efektif untuk melawan bakteri penyebab penyakit (Tanih *et al.*, 2015).

Proses uji antibakteri dilakukan dengan mengkultur bakteri patogen dengan Standar McFarland 0,5 kemudian diinokulasikan kedalam *Nutrien Agar*. Standar McFarland digunakan sebagai acuan untuk mengatur kekeruhan suspensi bakteri sehingga jumlah bakteri berada dalam kisaran tertentu untuk membakukan pengujian mikroba. Standar McFarland digunakan untuk menyiapkan suspensi bakteri dengan kepadatan optik tertentu, yang kemudian digunakan untuk menginokulasi pelat agar untuk pengujian kerentanan antibiotik. Standar McFarland adalah suspensi bakteri terstandar yang digunakan untuk mengatur kekeruhan suspensi bakteri hingga konsentrasi tertentu. Hal ini penting karena jika suspensi bakteri terlalu berat atau terlalu encer, dapat menyebabkan kesalahan hasil pengujian kerentanan antimikroba (CLSI, 2018).

Hasil uji dikatakan positif apabila terbentuknya daerah zona bening disekitar agar. Total ada 3 isolat yang memiliki nilai rata-rata zona bening terluas dan terjadi aktivitas antibakteri dari ke dua patogen. Kode tiga isolat tersebut adalah B.9.ST.1.4; B.13.ST.2.2; dan B.26.ST.3.4. Zona bening yang diamati pada 72 jam menunjukkan bahwa isolat B.26.ST.3.4 memiliki aktivitas tertinggi dengan nilai $28,05 \pm 0,9192$ terhadap patogen *E. coli* dan $23,45 \pm 10,2530$ terhadap patogen *S. aureus*. Isolat B.13.ST.2.2 memiliki aktivitas tertinggi dengan nilai $24,3 \pm 3,2527$ terhadap patogen *E. coli* dan $18,475 \pm 13,1168$ terhadap patogen *S. aureus*. Isolat B.9.ST.1.4 memiliki aktivitas tertinggi dengan nilai $14,95 \pm 2,3335$ terhadap patogen *E. coli* dan $11 \pm 2,1213$ terhadap patogen *S. aureus* (Gambar 1.).

Hasil identifikasi bakteri secara molekuler menunjukkan bahwa 3 isolat potensial antibakteri teridentifikasi sebagai *Bacillus subtilis* (B.13.ST.2.2), *Bacillus velezensis* (B.9.ST.1.4), dan *Bacillus amyloliquefaciens* (B.26.ST.3.4) dengan persen identifikasi di atas 98% sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 4.3. Hasil BLAST dengan persen identifikasi lebih dari 97% dapat dikategorikan sebagai spesies yang sama (Zebua *et al.*, 2020). Panjang sekuens dari ketiga isolat berkisar pada 1.500 bp, hal ini sesuai dengan primer universal yang digunakan yakni 1492R dan 27F. Hal ini didukung oleh hasil visualisasi pita DNA pada Gambar 2.

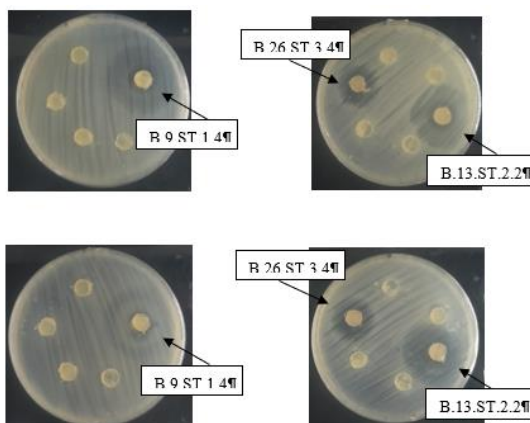
Identifikasi bakteri merupakan tahap pengujian 3 isolat aktif dari hasil uji antibakteri yang bertujuan untuk mengetahui jenis bakteri. Identifikasi bakteri yang dilakukan diantaranya adalah uji gram bakteri dan identifikasi molekuler 16s rRNA. Identifikasi molekuler dilakukan untuk mengetahui spesies bakteri ketiga isolat potensial. Hasil elektroforesis sample PCR dapat dilihat pada Gambar 3. Pita DNA ketiga sampel potensial muncul pada kisaran 1.500 base pair. Hasil BLAST sekuens bakteri disajikan pada Tabel 3. Hasil pewarnaan gram dari ke-tiga isolat bakteri potensial menunjukkan bahwa ketiganya merupakan bakteri gram positif (Gambar 2). Isolat B.9.ST.1.4 teridentifikasi sebagai bakteri *Bacillus velezensis* dengan nilai persen identifikasi mencapai 100%. Isolat B.13.ST.2.2 teridentifikasi sebagai bakteri *Bacillus subtilis* dengan nilai persen identifikasi mencapai 100%. Isolat B.26.ST.3.4 teridentifikasi sebagai bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* dengan nilai persen identifikasi mencapai 99.86%.

Tabel 2. Hasil aktivitas antibakteri

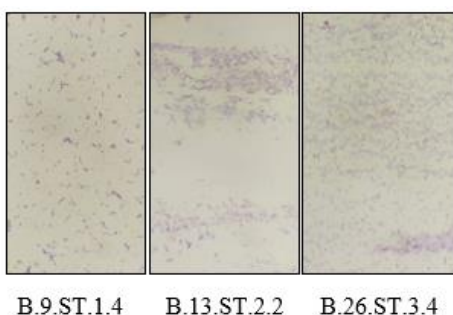
Kode Isolat	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
B.9.ST.1.4	$14,95 \pm 2,3335$	$11 \pm 2,1213$
B.13.ST.2.2	$24,3 \pm 3,2527$	$18,475 \pm 13,1168$
B.26.ST.3.4	$28,05 \pm 0,9192$	$23,45 \pm 10,2530$

Tabel 3. Hasil identifikasi molekuler

Kode Isolat	Identifikasi Spesies (BLAST)	Access Number	Sequece length (bp)	Ident (%)	Query cover (%)
B.9.ST.1.4	<i>Bacillus velezensis</i>	PP033969	1404	100.00%	100%
B.13.ST.2.2	<i>Bacillus subtilis</i>	PP033970	1418	100.00%	100%
B.26.ST.3.4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	PP033971	1381	99.86%	100%



Gambar 1. Hasil uji aktivitas antibakteri

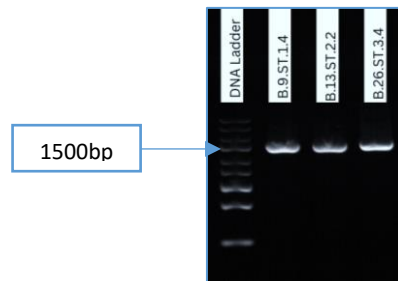


Gambar 2. Hasil uji pewarnaan gram

Hasil elektroforesis sample PCR untuk mengetahui keberadaan kluster gen biosintesis dapat dilihat pada Gambar 3. Ketiga isolat memiliki gen NRPS, isolat B.9.ST.1.4 memiliki gen PKS-II dan isolat B.26.ST.3.4 memiliki gen PKS-I (Tabel 4.). Ketiga isolat *Bacillus subtilis* (B.13.ST.2.2), *Bacillus velezensis* (B.9.ST.1.4), dan *Bacillus amyloliquefaciens* (B.26.ST.3.4) memiliki gen NRPS dengan basepair sebesar 550bp dan 800bp. Hasil dari proses pcr belum diketahui secara rinci NRPS dapat menyandikan fungsi yang belum diketahui. Berdasarkan penelitian Luo *et al.* (2015) *Bacillus subtilis* mengandung empat cluster gen nrps, srf, bmy, fen, dan loc, yang bertanggung jawab atas biosintesis lipopeptida seperti surfactins, plipastatins, bacillibactins, dan fengyins yang merupakan nonribosomal peptides (NRPs) yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri. Sekuens isolat *Bacillus amyloliquefaciens* (B.26.ST.3.4) memiliki gen PKS1 dengan panjang basepair berkisar dari 4000-800 bp. Sekuens isolat *Bacillus velezensis* (B.9.ST.1.4) memiliki gen PKS2 dengan panjang basepair berkisar dari 2000-100 bp. Berdasarkan penelitian Fan *et al.* (2018) kelompok pks2 *Bacillus velezensis* bertanggung jawab atas produksi makrolaktin sebagai produk biosintesis poliketida. Genom strain ini mengandung gen yang terkait dengan biosintesis metabolit sekunder, transportasi, dan antagonisme.

Tabel 4. Hasil uji kluster gen biosintesis

Kode Isolat	NRPS	PKS-I	PKS-II
B.9.ST.1.4	+	-	+
B.13.ST.2.2	+	-	-
B.26.ST.3.4	+	+	-



Gambar 3. Hasil elektroforesis 16s rRNA

KESIMPULAN

Aktivitas antibakteri isolat bakteri sedimen mangrove dengan kode isolat B.26.ST.3.4 memiliki aktivitas tertinggi dengan nilai $28,05 \pm 0,9192$ terhadap patogen *E. coli* dan $23,45 \pm 10,2530$ terhadap patogen *S. aureus*, selain itu terdapat dua isolat lain yang memiliki aktivitas antibakteri. Bakteri sedimen mangrove yang potensial sebagai antibakteri adalah *Bacillus velezensis* (B.9.ST.1.4), *Bacillus subtilis* (B.13.ST.2.2), dan *Bacillus amyloliquefaciens* (B.26.ST.3.4). Ketiga isolat (B.9.ST.1.4, B.13.ST.2.2 dan B.26.ST.3.4) memiliki gen NRPS, isolat B.9.ST.1.4 memiliki gen PKS-II dan isolat B.26.ST.3.4 memiliki gen PKS-I.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggelina, A.C., Pringgenies, D. & Setyati, W.A. (2021). Presence of Biosynthetic Gene Clusters (NRPS/PKS) in Actinomycetes of Mangrove Sediment in Semarang and Karimunjawa, Indonesia. *Environment and Natural Resources Journal*, 19(5), 391-401. doi: 10.32526/enrj/19/202100050
- Ayuningrum, D., Kristiana, R., Nisa, A.A., Radjasa, S.K., Muchlissin, S.I., Radjasa, O.K., Sabdono, A. & Trianto, A. (2019). Bacteria Associated with Tunicate, *Polycarpa aurata*, from Lease Sea Maluku, Indonesia Exhibiting Anti-Multidrug Resistant Bacteria. *Biodiversitas: Journal of Biological Diversity*, 20(4), 956-964. doi: 10.13057/biodiv/d200404
- Begum, A., Shilpi, R.Y. & Haque, A. (2020). Isolation and Identification of Salt Tolerant Bacteria Available in Different Depths of Soil in Sundarbans Mangrove Forest, Bangladesh. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 7(5), 40-56. doi: 10.22192/ijarbs
- CLSI. (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard. Eleventh Edition., M02-A11 32(1), 1-76.
- El Samak, M., Solyman, S.M. & Hanora, A. (2018). Antimicrobial activity of bacteria isolated from Red Sea marine invertebrates. *Biotechnology Reports*, 19, e00275. doi: 10.1016/j.btre.2018.e00275
- Escalante-Réndiz, D., de-la-Rosa-García, S., Tapia-Tussell, R., Martín, J., Reyes, F., Vicente, F., & Gamboa-Angulo, M. (2019). Molecular identification of selected *Streptomyces* strains isolated from Mexican tropical soils and their anti-*Candida* activity. *International journal of environmental research and public health*, 16(11), 1913. doi: 10.3390/ijerph16111913
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X. & Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in microbiology*, 9, 2491. doi: 10.3389/fmicb.2018.02491
- Jangla, P., Merai, K., Patel, D. & Sheth, K. (2021). Preparation and Evaluation of BB Concealer Cream Containing Neem Oil for Acne Treatment. *Indian Drugs*, 58(11), 66-69. doi: 10.53879/id.58.11.12 450

- Kramer, J.C., Bohringer, N., Mettal, U. & Schaberle, T.F. (2023). Functional In Vitro and In Vivo Analysis of Biosynthetic Genes by Heterologous Expression in *E. coli*. *STAR Protocols*, 4(3), 102531. doi: 10.1016/j.xpro.2023.102531
- Kristiana, R., Sibero, M. T., Farisa, M.Y., Ayuningrum, D., Dirgantara, D., Hanafi, M., Radjasa, O.K., Sabdono, A. & Trianto, A. (2019). Antibacterial Potential of Nudibranch-Associated Bacteria from Saparua and Nusa Laut Islands, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 20(7), 1811-1819. doi: 10.13057/biodiv/d200704
- Li, H., Li, L., Chi, Y., Tian, Q., Zhou, T., Han, C., Zhu, Y. & Zhou, Y. (2020). Development of A Standardized Gram Stain Procedure for Bacteria and Inflammatory Cells Using an Automated Staining Instrument. *Microbiologi Open*, 9(9), 1099. doi: 10.1002/mbo3.1099
- Luo, C., Liu, X., Zhou, H., Wang, Z. & Chen, Z. (2015). Nonribosomal Peptide Synthase Gene Clusters for Lipopeptide Biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their Phenotypic Functions. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), 422-431. doi: 10.1128/AEM.02921-14
- Maulidiyah, Z., Seniwati, S., Rusli, R. & Naid, T. (2021). Isolasi Bakteri Rhizosfer Tanama Nilam (*Pogostemon cablin* Benth) yang Berpotensi sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri terhadap Bakteri Penyebab Infeksi Saluran Pencernaan. *Window of Health: Jurnal Kesehatan*, 3(2), 132-139. doi: 10.33096/woh.v3i2.601
- Moon, S., Ham, S., Jeong, J., Ku, H., Kim, H. & Lee, C. (2023). Temperature Matters: Bacterial Response to Temperature Change. *Journal of Microbiology*, 61(3), 343-357. doi: 10.1007/s12275-023-00031-x
- Nurliana, N., Siregar, B.H., Sari, W.E., Helmi, T.Z. & Sugito, S. (2022). Identification of Cellulolytic Lactic Acid Bacteria from The Intestines of Laying Hens Given AKBISprob Based on 16S Ribosomal Ribonucleic Acid Gene Analysis. *Veterinary World*, 15(7), 1650. doi: 10.14202/vetworld.2022.165-1656
- Nursyahid, Vanbudi, M.B.M.A., Meilawati, S., Prasetyo, I.A. & Susanti, O. (2022). Agen Pendegradasi Mikroplastik dari Mikroba Endofit Mangrove *Avicennia marina*. *Journal of Marine Research*, 11(4), 779-784. doi: 10.14710/jmr.v11i4.35487
- Pranaya, K., Bhat, B.N., Devi, G.U. & Triveni, S. (2020). Colony, Morphological and Biochemical Characteristics of Cotton Phyllosphere Bacteria and Its Antagonistic Activity Against the *Alternaria* Leaf Spot of Cotton. *International Journal of Chemical Studies*, 8(6), 1103-1107. doi: 10.22271/chemi.2020.v8.i6p.10909
- Pringgenies, D. & Setyati, W.A. (2021). Antifungal Strains and Gene Mapping of Secondary Metabolites in Mangrove Sediment from Semarang City dan Karimunjawa Islands, Indonesia. *AIMS Microbiology*, 7(4), p.449. doi: 10.3934/microbiol.2021030
- Putri, I., Jannah, S.N. & Purwantisari, S. (2020). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from *Apis mellifera* and their Potential as Antibacterial Using In Vitro Test Against Growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *NICHE: Journal of Tropical Biology*, 3(1), 26-34. doi: 10.14710/niche.3.1.26-34
- Sabdaningsih, Cristianawati, A.O., Sibero, M.T., Aini, M., Radjasa, O.K., Sabdono, A. & Trianto, A. (2019). Anti MDR *Acinetobacter baumannii* of the Sponges-Associated Fungi from Karimunjawa National Park. *Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation*, 12(5), 1970-1983.
- Setiyorini, A., Pringgenies, D. & Ridlo, A. (2023.) Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asosiasi Daun *Cymodocea serrulate* di Perairan Pulau Panjang, Jepara. *Journal of Marine Research*, 12(4), 663-669. doi: 10.14710/jmr.v12i4.38169
- Tanih, N.F., Sekwadi, E., Ndip, R.N. & Bessong, P.O. (2015). Detection of pathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from cattle and pigs slaughtered in abattoirs in Vhembe District, South Africa. *The Scientific World Journal*, 2015(1), 1-8. doi: 10.1155/2015/195972
- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB express*, 8(1), 1-14. doi: 10.1186/s13568-018-0536-0
- Zebula, A.H.P., Nursyirwani, N. & Feliatra, F. (2020). Molecular Identification of Proteolytic Bacteria From Mangrove Sediment in Dumai Marine Station. *Asian Journal of Aquatic Sciences*, 3(2), 179-188. doi: 10.31258/ojoas.3.2.179-188