

# Aktivitas Antagonis Bakteri yang Berasosiasi dengan Teritip (*Balanus sp.*) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus cereus*

Gita Wismayanti, Sri Sedjati dan Agus Trianto\*

Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro  
Jl. Prof. H. Soedharto, SH, Tembalang Semarang Jawa Tengah 50275  
Email: agustrianto.undip@gmail.com

## Abstract

### **Antagonistic Activity of The Barnacle (*Balanus sp.*) Symbiotic Bacteria Against *Escherichia coli* and *Bacillus cereus***

Marine invertebrates are the most productive source of bioactive compounds. However, most of the compounds originally produced by the microorganisms living associated with the invertebrates. Barnacle is an invertebrate that has a unique interaction with bacteria. *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* are the cause of the foodborne disease that causes of remarkedly losses in the food industry. The barnacle was collected from Panjang Island, Jepara. The bacterial isolates were obtained by serial dilution followed by isolation based on morphological characteristics. The antagonistic assay to *E. coli* dan *B. cereus* was utilized for screened the isolates. Then, the active isolates were cultured for the further test with the disc diffusion agar method of the supernatant followed by the extracts. The most active isolates were identified based on molecular method. A total of 14 isolates were obtained from the *Balanus sp.*, which six of them have activity against the *E. coli* and *B. cereus*. The isolates TJ 5.4 and TJ 5.5 have the strongest activity the bacteria. Base on the analyses of the BLAST and phylogenetic tree the isolates showed 99% homology the *Bacillus wiedmannii* (TJ 5.4) and *Lysinibacillus macroides* (TJ 5.5).

**Keyword:** Associate bacteria; *Balanus sp.*; foodborne; antibacterial

## Abstrak

Invertebrata laut merupakan salah satu sumber bahan bioaktif yang paling produktif. Sebagian senyawa yang terdapat dalam biota laut, sejatinya diproduksi oleh mikroorganisme yang hidup berasosiasi dengan biota laut tersebut. Teritip merupakan salah satu hewan invertebrata yang memiliki berbagai interaksi unik dengan bakteri. Bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus cereus* merupakan dua dari beberapa bakteri patogen yang sering menjadi agen penyebab foodborne disease. Teritip dikoleksi dari Pulau Panjang, Jepara. Isolat bakteri diperoleh dengan metoda pengenceran bertingkat dan dilanjutkan isolasi berdasarkan karakteristik morfologis. Uji antagonis terhadap *E. coli* dan *B. cereus* digunakan untuk menskrining bioaktivitas isolat. Isolat yang aktif dikultur untuk uji lanjut yaitu supernatant dan dilanjutkan ekstraknya dengan metoda disc diffusion agar. Bakteri yang paling aktif diidentifikasi secara molekuler untuk mengetahui spesiesnya. Sebanyak 14 isolat bakteri diperoleh dari *Balanus sp.* dimana enam diantaranya memiliki aktivitas terhadap bakteri uji. Isolat TJ 5.4 dan TJ 5.5 memiliki aktivitas paling kuat terhadap *E. coli* dan *B. cereus*. Berdasarkan pengolahan sekuen dan analisis pohon filogenetik, dua isolat bakteri tersebut memiliki homologi 99% terhadap bakteri *Bacillus wiedmannii* (TJ 5.4) dan *Lysinibacillus macroides* (TJ 5.5).

**Kata kunci :** Bakteri Simbion; *Balanus sp.*; foodborne; Uji Antagonis

## PENDAHULUAN

Invertebrata laut merupakan sumber senyawa bioaktif utama dari ekosistem laut

(Janakiram *et al.*, 2015). Tingginya keanekaragaman invertebrata laut di kawasan Indo-Pasifik menjadi salah satu daya Tarik bagi peneliti dalam pencarian senyawa

bioaktif. Namun demikian, senyawa bioaktif yang terdapat pada hewan invertebrata laut umumnya terdapat dalam konsentrasi yang rendah (Radjasa *et al.*, 2007, Trianto *et al.*, 2011). Hal ini menjadi masalah yang utama dalam pengembangan senyawa bioaktif dari alam untuk menjadi obat.

Pada saat ini banyak peneliti yang mengeksplorasi bahan bioaktif dari mikroorganisme yang hidup berasosiasi dengan invertebrata (Habbu *et al.*, 2016). Teritip merupakan salah satu hewan invertebrata yang memiliki berbagai interaksi terhadap bakteri simbiosis yang terdapat pada tubuhnya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh De Gregoris *et al.* (2012), menunjukkan bahwa bakteri yang terdapat pada teritip memiliki peran terbanyak pada proses penempelan teritip pada substrat dibandingkan dengan bakteri biofilm pada substrat batu. Larva teritip diduga dapat mendeteksi biofilm mikroba yang memiliki keterkaitan parental dan menggunakan informasi ini untuk menetap dekat dengan anggota spesiesnya sendiri.

Bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus cereus* merupakan dua dari beberapa bakteri patogen yang sering menjadi agen penyebab penyakit bawaan makanan (foodborne disease) (Wang *et al.*, 2015). *Escherichia coli* dan *Bacillus cereus* adalah bakteri yang berbeda gram. *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif (Scherrer, 1984), sedangkan *Bacillus cereus* adalah bakteri gram positif (Griffiths dan Schraft, 2017). Seleksi kedua bakteri tersebut didasarkan atas adanya perbedaan gram untuk mengetahui klasifikasi aktivitas antagonis dari senyawa antibakteri berdasarkan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang berbeda gram (Waluyo, 2007). Kontaminasi mikrobiologis oleh bakteri *E. coli* dan *B. cereus* menyebabkan terjadinya proses pembusukan pada makanan dengan cara membentuk formasi biofilm. Keterikatan potensi pembusukan dan bakteri patogen ke permukaan makanan dan formasi biofilm selanjutnya merupakan tantangan serius bagi industri makanan, karena hal ini dapat menyebabkan kontaminasi silang produk, yang mengakibatkan umur simpan rendah

dan penularan penyakit bawaan makanan. Pada industri pengolahan makanan, mikroorganisme seringkali dikaitkan dengan adanya komunitas multispesies yang kompleks, sementara itu interaksi bakteri telah terbukti memiliki peran kunci dalam keterikatan dan pelepasan sel dari biofilm, dan juga resistensi komunitas biofilm terhadap perlakuan antimikroba (Giaouris *et al.*, 2014). Penelitian yang dilakukan oleh Emmanuel *et al.* (2012), menunjukkan bahwa beberapa isolat bakteri simbiosis teritip memiliki aktivitas antibakteri terhadap sepuluh bakteri patogen manusia yaitu antaralain, *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Enterobacter aerogenes*. Pada tulisan ini akan dibahas tentang potensi bakteri yang berasosiasi dengan teritip sebagai sumber senyawa antibakteri.

## MATERI DAN METODE

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri yang diisolasi dari teritip *Balanus* sp. yang diambil dari perairan Pulau Panjang, Kabupaten Jepara. Kultur bakteri patogen, purifikasi bakteri simbiosis, identifikasi bakteri simbiosis, skrining, dan uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro Semarang. Identifikasi molekular dilakukan di Tropical Marine Biotechnology, Laboratorium Kelautan dan Oseanografi. Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental laboratoris.

Pengambilan sampel teritip dilakukan di perairan Pulau Panjang, Kabupaten Jepara. Pengambilan sampel teritip tersebut dilakukan dengan metode purposive sampling. Pengambilan sampel teritip dilakukan dengan menggunakan tatak dan palu. Sampel teritip diambil dengan cara menatah sebagian koloni teritip secara perlahan kemudian sampel disimpan di dalam botol sampel yang sudah steril guna meminimalisir kontaminasi. Botol sampel kemudian diberi label bertuliskan lokasi sampel dan tanggal pengambilan sampel.

Sampel teritip dimasukkan ke dalam cooler box sebagai media penyimpanan sementara kemudian sampel dibawa ke laboratorium (Emmanuel *et al.*, 2011). Parameter lingkungan yang diukur meliputi pH, salinitas dan suhu perairan.

Identifikasi morfologi dan determinasi teritip dilakukan untuk menentukan genus teritip yang ditemukan di lokasi dengan mengacu pada buku identifikasi teritip "Zoologische Verhandelingen" (Henry dan Patsy, 1975).

### Isolasi dan Purifikasi Bakteri Symbion Teritip *Balanus* sp.

Sampel teritip yang telah didapatkan dibilas dengan air laut steril secara merata untuk menghilangkan pengotor dan bakteri yang hanya menempel pada permukaan teritip. Seluruh bagian teritip baik jaringan keras maupun jaringan lunak dihaluskan dengan *mortar* dan *pestle* yang telah disterilkan dan dilanjutkan dengan proses pengenceran bertingkat (Emmanuel *et al.*, 2011). Isolasi bakteri symbion dilakukan dengan metode agar tuang (*pour plate*). Pengamatan terhadap karakteristik morfologi bakteri symbion teritip meliputi bentuk koloni, tepi, dan warna koloni (Dwidjoseputro *et al.*, 1993). Setiap koloni yang berbeda diambil dan dipisahkan dengan menggoreskan ke permukaan media menggunakan jarum ose ke media marine Zobell 2216E yang telah disiapkan di cawan petri.

Skrining aktivitas antagonis dari isolat bakteri symbion teritip dilakukan dengan menguji bakteri symbion terhadap dua bakteri patogen (*Escherichia coli* dan *Bacillus cereus*). Metode skrining aktivitas antibakteri dilakukan berdasarkan metode dari Emmanuel *et al.*, (2011) yang dimodifikasi. Skrining isolat bakteri dilakukan dengan dua tahap, yaitu dengan metode agar *overlay* dan dikonfirmasi dengan metode difusi agar.

### Uji Aktivitas Antibakteri Supernatan Bakteri Symbion Teritip

Uji aktivitas antibakteri secara difusi dengan menggunakan *paper disc* dilakukan setelah tahapan skrining guna

mengkonfirmasi aktivitas antibakteri dari isolat bakteri symbion yang positif membentuk zona hambat. Bakteri symbion dikultur ke dalam 10 mL media Zobell 2216E cair kemudian diinkubasi selama 48 jam. Isolat bakteri symbion yang telah diinkubasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke tabung steril untuk kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri (Emmanuel *et al.*, 2011).

Sebanyak 100  $\mu$ L biakan bakteri patogen yang telah diinkubasi selama 24 jam ditetaskan dan diratakan dengan menggunakan spreader pada cawan petri berisi media Zobell 2216E agar dan dibiarkan selama 30 menit agar bakteri dapat berdifusi ke dalam media. Supernatan bakteri symbion masing-masing diambil sebanyak 10  $\mu$ L/disc dan ditetaskan ke *paperdisc* (*Advantec paper disc*, dengan diameter 6 mm). Kemudian, *paperdisc* diletakan di atas permukaan agar secara aseptis dan diinkubasikan pada media nutrient agar pada suhu ruang untuk diamati pada 24 jam dan 48 jam.

### Ekstraksi dan Uji Bioaktivitas Ekstrak

Isolat bakteri symbion yang memiliki aktivitas antibakteri terbaik kemudian dikultur masal. Kultur bakteri dengan diekstrak menggunakan etil asetat dengan perbandingan kultur bakteri : pelarut sebanyak 1:1 (v/v). Etil asetat dan air merupakan pelarut *immiscible* sehingga dapat digunakan untuk memisahkan fraksi organik dari media (Trianto *et al.*, 2011). Fraksinasi dilakukan pada corong pemisah. Sampel digojok selama kurang lebih 10 menit dan didiamkan hingga terpisah menjadi dua fraksi. Fraksi semi polar dikoleksi dan dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 35-40 °C. Ekstrak bakteri symbion kemudian diencerkan dengan pelarut dimetil sulfoksida (DMSO) dengan konsentrasi 100  $\mu$ g/ml. Kemudian 10  $\mu$ L/disc dan ditetaskan ke *paperdisc* untuk uji antibakteri. Prosedur selanjutnya sama seperti pada uji aktivitas supernatant.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan untuk melihat susunan atau komponen

senyawa pada ekstrak. Eluen yang digunakan adalah Ekstrak etil asetat bakteri simbion ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada posisi 1 cm dari tepi bawah plat silika. Plat kemudian dielus dengan kloroform-etil asetat = 9:1 (v/v) berdasarkan hasil uji coba.. Proses dihentikan ketika eluen sudah mencapai kira-kira 1 cm dari tepi atas plat silika. Hasil pemisahan komponen senyawa diamati di bawah sinar UV 365 nm. Noda pada plat silika yang tampak, kemudian diberi tanda (Julita, 2012).

### Identifikasi Molekular Bakteri

Identifikasi molekular bakteri simbion teritip meliputi ekstraksi DNA, amplifikasi PCR sekuen gen 16S rDNA, sekuensing DNA, dan analisis filogenetik. Ekstraksi DNA dilaksanakan dengan menggunakan metode Chelex 100. Ada beberapa kelebihan dari metode chelex 100 yaitu memiliki prosedur yang sederhana, cepat, melibatkan pelarut non organik, dan tidak memerlukan banyak tabung untuk mentransferkan berbagai jenis sampel (Walsh *et al.*, 1991). Selanjutnya, proses amplifikasi dilakukan sesuai dengan metoda yang digunakan Lee *et al.* (2006). Ekstrak DNA untuk sekuen 16 rDNA diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer universal 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan primer spesifik 1492R (5'TACGGTAAACCTTGT TACGA CTT-3'). Total volume dalam tabung PCR adalah 50 µl yang terdiri dari larutan campuran Kappa Kit Master (25 µL), primer universal 27F (2 µL), primer 1492R (2 µL), ddH<sub>2</sub>O (18,5 µL), dan dNTP (2,5 µL). PCR dilakukan dengan tahapan sebagai berikut: denaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit sebagai pemanasan awal, kemudian 30 siklus (denaturasi pada suhu 95 °C selama 1 menit); *annealing* pada suhu 55 °C selama 1 menit; *extension* pada suhu 72 °C selama 7 menit, kemudian produk yang dihasilkan oleh PCR dianalisa menggunakan gel elektroforesis 1% dan hasilnya divisualisasikan oleh UVIDoc.

Sekuensing DNA bakteri simbion teritip dilakukan pada PT. Genetika Science Indonesia, Jakarta Barat. Hasil sekuen kemudian dianalisis homologinya dengan menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) database pada National Center for Biotechnology Information, National

Institute for Health, USA (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul *et al.*, 1997).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

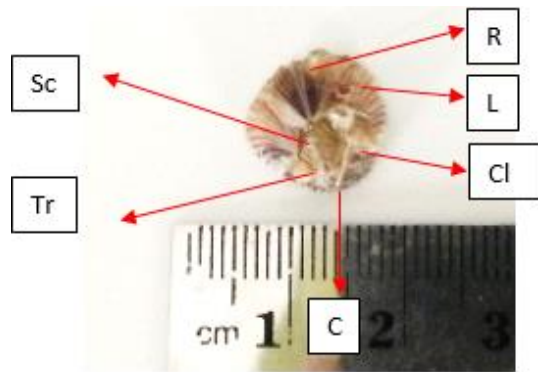
Sampel teritip yang diambil di Pulau Panjang, Kabupaten Jepara, pada titik koordinat S 06o34'37.4" dan E 110o37'51.4" sebanyak satu koloni. Berdasarkan hasil identifikasi menggunakan buku "Zoologische Verhandelingen" (Henry dan Patsy, 1975), sampel teritip yang diperoleh termasuk dalam genus *Balanus*. Ciri genus *Balanus* adalah adanya strip longitudinal yang khas tampak mengelilingi bagian cangkang teritip. Corak garis yang tampak di sekeliling cangkang berwarna ungu atau lavender dan diselingi dengan garis tebal berwarna putih. Pada bagian *scutum* tampak berwarna ungu. Kemudian pada tepi tergum tampak garis berwarna ungu.

Isolasi bakteri yang berasosiasi dengan teritip dari Perairan Pulau Panjang diperoleh sebanyak 14 isolat dengan menggunakan media marine Zobell 2216E. Hasil uji antagonis terhadap *E. coli* dan *B. cereus* menunjukkan dari 14 isolat bakteri enam diantaranya memiliki aktivitas terhadap bakteri uji yang ditandai dengan munculnya zona hambat di sekitar area *dotting*.

**Tabel 1.** Skrining aktivitas antagonis isolat bakteri simbion *Balanus amphitrite* terhadap *Escherichia coli* dan *Bacillus cereus*

No.	Kode Isolat	<i>E. coli</i>	<i>B.cereus</i>
1	TJ 5.1	-	-
2	TJ 5.2	-	-
3	TJ 5.3	-	+
4	TJ 5.4	+	+
5	TJ 5.5	+	+
6	TJ 3.6	-	-
7	TJ 3.7	-	-
8	TJ 4.8	-	-
9	TJ 4.9	-	-
10	TJ 3.10	+	+
11	TJ 4.11	-	+
12	TJ 5.12	+	+
13	TJ 3.13	-	-
14	TJ 6.14	-	-

Keterangan : (+) : aktif; (-) : tidak aktif



**Gambar 1.** Teritip Tampak Apikal. Sc : scutum; Tr : tergum; R : rostrum; L: lateral; Cl : carina lateral.

Keberadaan bakteri yang berasosiasi dengan teritip menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi kehidupan teritip. Biofilm mikroba pada biota teritip berfungsi sebagai penyedia informasi kekerabatan antarspesies teritip. Biofilm merupakan salah satu *chemical cue* bagi larva teritip untuk menempel (Chlayon et al., 2018). Pada koloni yang sudah matang, penempelan larva teritip dipicu oleh feromon yang disebut *settlement-inducing protein complex* (SIPC) (Zazzaro et al. 2018).

Banyak penelitian yang membuktikan bahwa bakteri laut baik yang berasosiasi dengan invertebrate maupun *free living* bakateri merupakan penghasil bahan bioaktif dengan berbagai bioaktivitas (Schinke et al., 2017). Namun, eksplorasi bahan bioktif pada teritip masih sangat sedikit dilakukan. Pada berbergai peneliti teritip justru sebagai indicator mengingat teritip adalah biota penempel yang banyak menimbulkan kerugian (Wang et al., 2017).

Hasil uji antibakteri supernatan menunjukkan bahwa isolat bakteri TJ 5.4 memiliki aktivitas antagonis tertinggi terhadap bakteri *B. cereus*, dengan zona hambat sebesar  $2,96 \pm 0,88$  mm dan  $1,90 \pm 0,09$  mm terhadap bakteri *E. coli*. Sedangkan isolat bakteri simbiosis TJ 5.5 memiliki aktivitas tertinggi terhadap *E. coli* dengan diameter zona hambat sebesar  $2,06 \pm 0,67$  mm dan  $1,68 \pm 0,45$  mm terhadap *B. cereus*. Diameter zona hambat dari kedua bakteri tersebut mengalami penurunan di masa inkubasi 48 jam. Zona hambat isolat TJ 5.4 menurun

menjadi  $2,63 \pm 0,73$  mm terhadap bakteri *B.cereus* dan  $0,43 \pm 0,83$  mm terhadap bakteri *E. coli*. Sedangkan isolat TJ 5.5 mengalami penurunan diameter zona hambat menjadi  $1,97 \pm 0,94$  mm terhadap *E. coli* dan zona hambat nihil ( $0,00 \pm 0,00$  mm) terhadap bakteri *B. cereus*. Kedua isolat bakteri tersebut, kemudian dikultur untuk diekstraksi dan diuji bioaktivitasnya. Pada penelitian kami yang terdahulu juga menunjukkan beberapa bakteri mengalami penurunan atau kehilangan bioaktivitasnya setelah 48 jam (Trianto et al., 2019).

Hasil uji bioaktivitas ekstrak bakteri isolat TJ 5.4 konsentrasi 1.000 µg/disc menunjukkan nilai tertinggi dengan zona hambat sebesar  $13,64 \pm 0,76$  mm terhadap bakteri *B. cereus* dan  $9,10 \pm 2,10$  mm terhadap bakteri *E. coli*. Pada konsentrasi ekstrak bakteri dan waktu inkubasi yang sama, isolat TJ 5.5 memiliki diameter zona hambat sebesar  $8,55 \pm 0,08$  mm terhadap *B. cereus* dan  $4,65 \pm 0,75$  mm terhadap bakteri *E. coli*. Zona hambat yang terbentuk pada kedua ekstrak bakteri cenderung membentuk gradasi dari bening di sekitar paperdisc hingga keruh dan tidak menunjukkan daerah clearing zone yang terlihat nyata. Zona hambat pada kedua ekstrak mengalami penyempitan di masa inkubasi 48 jam. Zona hambat dengan karakteristik tersebut, dapat diklasifikasikan bahwa zat antibakteri yang ada di dalam ekstrak bakteri tergolong zat antibakteri berspektrum luas karena dapat menghambat (bakteriostatik) pertumbuhan bakteri gram negatif *E. coli* dan bakteri gram positif *B. cereus* (Kohanski et.al., 2007). Besar kecilnya zona hambat yang terbentuk dipengaruhi oleh berbagai faktor: (1) konsentrasi zat, semakin tinggi konsentrasi zat antibakteri maka diameter zona hambat yang terbentuk semakin besar (Waluyo, 2007); (2) pengorganisasian dinding sel bakteri juga merupakan faktor penting yang dapat mempengaruhi tingkat efisiensi antibakteri. Bakteri gram negatif biasanya memiliki membran luar terorganisir dan lebih kompleks daripada bakteri gram positif, dan kehadiran membran luar yang tersusun atas lipopolisakarida yang padat membuat bakteri gram negatif lebih tahan terhadap desinfektan daripada bakteri gram positif (Wang et al., 2015).

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut etil asetat. Telah disebutkan pada penelitian sebelumnya bahwa bakteri simbiosis teritip yang diekstrak dengan pelarut semi polar etil asetat dapat mengekstrak senyawa bioaktif yang paling unggul dibandingkan dengan pelarut air, butanol, dietil eter, dan kloroform dalam melawan 10 bakteri patogen manusia termasuk di dalamnya *E. coli* dan *B. cereus* (Emmanuel et al., 2011).

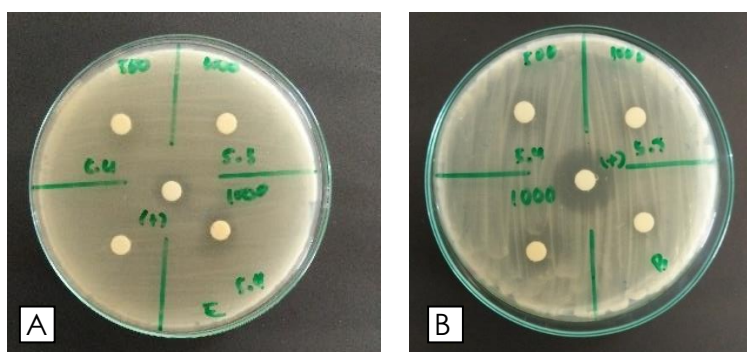
Senyawa metabolit sekunder isolat bakteri simbiosis teritip TJ 5.4 dan TJ 5.5 diekstrak dengan menggunakan pelarut etil asetat (Ahmed, 2012). Eluen yang digunakan yaitu, etil asetat-kloroform sebanyak 1 : 9 (v/v). Menurut Julita (2012), sistem eluen dengan perbandingan etil asetat-kloroform sebanyak 1 : 9 (v/v) merupakan sistem yang digunakan untuk menentukan senyawa golongan flavonoid. Hasil visualisasi pendugaan senyawa menunjukkan kedua

**Tabel 2.** Uji antibakteri supernatan bakteri simbiosis teritip terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli*.

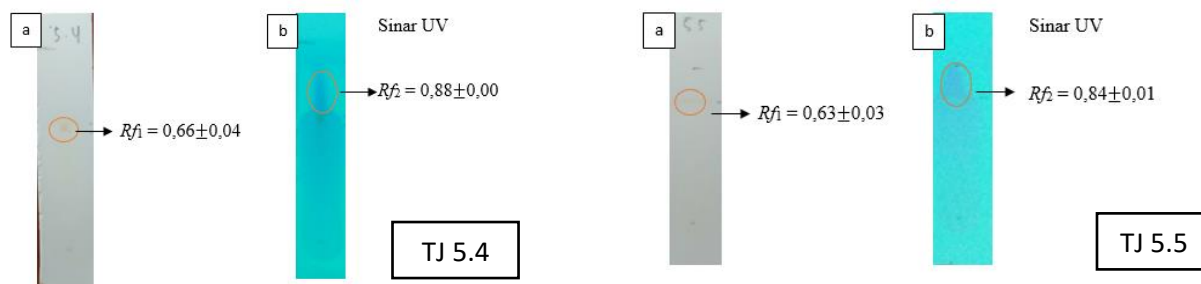
No.	Kode Isolat	Diameter Zona Hambat (mm)			
		<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>	
		24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
1.	TJ 5.3	1,36±0,68	0,00±0,00	1,90±0,09	0,00±0,00
2.	TJ 5.4	2,96±0,88	2,63±0,73	1,84±0,47	0,43±0,83
3.	TJ 5.5	1,68±0,45	0,00±0,00	2,06±0,67	1,97±0,94
4.	TJ 3.10	2,21±0,38	0,54±0,76	1,40±0,54	1,57±1,12
5.	TJ 4.11	2,18±0,88	2,17±0,45	1,72±0,38	1,83±0,27
6.	TJ 5.12	1,60±1,32	0,61±0,86	1,96±0,10	0,57±0,83

**Tabel 3.** Bioaktivitas ekstrak bakteri simbiosis *Balanus* sp. terhadap *B. cereus* dan *E. coli* pada konsentrasi 1000 µg/disc.

No.	Kode Isolat	Konsentrasi (µg/disc)	Diameter zona hambatan (mm)			
			<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>	
			24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
1	TJ 5.4	500	9,22±0,38	6,00±1,27	7,60±1,87	4,73±2,61
		1.000	13,64±0,76	9,05±1,10	9,10±2,10	6,78±0,38
2	TJ 5.5	500	6,92±0,12	4,83±1,02	2,42±0,68	1,92±0,22
		1.000	8,55±0,08	6,87±1,57	4,65±0,75	3,01±0,69



**Gambar 2.** Zona hambatan yang dihasilkan dari ekstrak bakteri simbiosis *Balanus* sp. selama 24 jam. a. Bioaktivitas ekstrak terhadap bakteri *E. coli*; b. Bioaktivitas ekstrak terhadap bakteri *B. cereus*;



**Gambar 3.** Profil pemisahan senyawa sampel dengan menggunakan eluen etil asetat : kloroform (1:9). a. Pengamatan secara langsung; b. pengamatan dengan bantuan sinar UV.

ekstrak bakteri simbiosis teritip menampilkan dua noda terpisah pada plat silika yang diamati di bawah sinar UV.

Hasil identifikasi molekuler menunjukkan bahwa isolat dengan kode TJ 5.4 memiliki homologi 99% terhadap bakteri *Bacillus wiedmannii* dan isolat TJ 5.5 memiliki homologi 99% terhadap bakteri *Lysinibacillus macroides*. *Bacillus wiedmannii* merupakan bakteri probiotik (Miller et.al, 2018). Isolat bakteri simbiosis TJ 5.5 (*Lysinibacillus macroides*) diduga berperan terhadap pembentukan kalsium karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) pada teritip. Hasil penelitian Banarjee dan Josh (2014) menemukan bakteri *Lysinibacillus macroides* yang dapat membentuk biofilm dan memiliki peran utama dalam proses kalsifikasi di alam. Berdasarkan hasil uji antagonis, zona hambat oleh bakteri *Bacillus wiedmannii* lebih luas dibandingkan dengan diameter zona hambat *Lysinibacillus macroides*. Hal tersebut terjadi karena pada bakteri *Bacillus wiedmannii* diduga mengandung senyawa yang lebih toksik apabila dibandingkan dengan bakteri *Lysinibacillus macroides*.

## KESIMPULAN

Sebanyak 14 isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari teritip *Balanus* sp., dua diantaranya terbukti memiliki aktivitas antagonis tertinggi terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus cereus*, yaitu bakteri dengan kode isolat TJ 5.4 dan TJ 5.5. Zona hambat terbesar dihasilkan oleh ekstrak bakteri simbiosis TJ 5.4 ( $1000 \mu\text{g}/\text{disc}$ ) sebesar  $13,64 \pm 0,76$  mm terhadap bakteri *B. cereus* dan  $7,60 \pm 1,87$  mm terhadap bakteri *E. coli*. Zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak

bakteri simbiosis TJ 5.5 ( $1000 \mu\text{g}/\text{disc}$ ) sebesar  $6,92 \pm 0,12$  mm terhadap bakteri *B. cereus* dan  $2,42 \pm 0,68$  mm terhadap bakteri *E. coli*. Hasil BLAST homologi sekuen 16S rRNA bakteri simbiosis teritip TJ 5.4 memiliki homologi sebesar 99% dengan bakteri *Bacillus wiedmannii*, sedangkan bakteri simbiosis teritip TJ 5.5 memiliki homologi sebesar 99% dengan bakteri *Lysinibacillus macroides*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, N. 2012. Isolation and Identification of Secondary Metabolites Producing Organisms from Marine Sponge. *Discovery*, 1(1):14-17.
- Altschul, S.F., Thomas L.M., Alejandro A.S., Jinghui Z., Zheng Z, Webb M., & David J. L. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402.
- Banarjee, S., & Joshi, S.R. 2014. Ultrastructural Analysis of Calcite Crystal Patterns Formed by Biofilm Bacteria Associated with Cave Speleothems. *J. Microscop. Ultrastruct.* 2:217-223.
- Chlayon, T., Mitsuyasu I., Nobuhiro C. 2018. Combined protective action of barnacles and biofilm on concrete surface in intertidal areas. *Construction and Building Materials*, 179:477-487.
- De Gregoris, T.B., L. Khandeparker, A.C. Anil, E. Mesbahi, J.G. Burgess, & A.S. Clare. 2012. Characterisation of The Bacteria Associated with Barnacle, *Balanus amphitrite*, Shell and Their Role in Gregarious Settlement of Cypris larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 413:7-12.
- Dwidjoseputro, D. 1993. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Djambatan, Jakarta.



- Emmanuel, S., Joshua J., & Murugan, A. 2011. Antagonistic Activity of the Barnacle (*Balanus amphitrite*) Associated Bacteria Against Human Bacterial Pathogens. *World App. Sci. J.* 12(2):202-207.
- Giaouris, E., Even, H., Michel, H., Nikos, C., Solveig L., Trond M., & George-John, N. 2014. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Sci.* 97(3):298-309.
- Griffiths, M.W., & Schraff, H. 2017. *Bacillus cereus* food poisoning. In *Foodborne Diseases (Third Edition)*; 395-405.
- Habbu, P., Warad, V., Shastri, R., Madagundi, S. & Kulkarni, V.H., 2016. Antimicrobial metabolites from marine microorganisms. *Chinese J. Nat. Med.* 14(2):101-116.
- Henry, D.P., & Patsy. 1975. Zoologische Verhandelingen: The *Balanus amphitrite* Complex (Cirripedia, Thoracica), Brill, Leiden.
- Janakiram, N.B., Altaf M., & Chinthalapally V. R. 2015. Sea Cucumbers Metabolites as Potent Anti-Cancer Agents. *Mar. Drugs.* 13(5):2909-2913.
- Julita, N. 2012. Aktivitas Antibakteri Senyawa Flavonoid dari Tumbuhan Paku Perak (*Pityrogramma calomelanos*) (Antibacterial Activity Of Flavonoid Compound From Silver Fern (*Pityrogramma calomelanos*)). *Unesa J. Chem.* 1(1):75-79.
- Kar, Ashutosh. 2009. Farmakognosi & Farmakobioteknologi Edisi 2. Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A. & Collins, J.J., 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5):797-810.
- Lee, J. W., Douglas D. B., Max J. Paape, Ming-Kuei H, & Xin Z. 2006. Characterization of Cytokine Expression in Milk Somatic Cells During Intramammary Infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by Real-Time PCR. *Veterinary Res.* 37(2):219-229.
- Miller, Jihavi J., Sarah M. B., Martin W., & Jasna K. 2018. Intraclade Variability in Toxin Production and Cytotoxicity of *Bacillus cereus* Group Type Strains and Dairy-Associated Isolates. *App. Environ. Microbiol.* 84(6):e02479-17
- Radjasa, O.K., Siti I.O.S., Agus S., Jutta W., Johannes F.I., Lammler, C., & Risk, M.J. 2007. Antibacterial Activity of Marine Bacterium *Pseudomonas* sp. Associated with Soft Coral *Sinularia polydactyla* against *Streptococcus equi* Sub sp. zooepidemicus. *Int.J. Pharm.* 3(2):170-174.
- Scherrer, R. 1984. Gram's staining reaction, Gram types and cell walls of bacteria. *Trends in Biochem. Sci.* 9(5):242-245.
- Schinke C., Thamires M., Sonia C. N. Q., Itamar S. Melo, and Felix G. R. 2017. Antibacterial Compounds from Marine Bacteria, *J. Nat. Prod.* 80:1215-1228
- Trianto, A., Idam H., Nicole J. D. V., and Junichi T. 2011. Halioxepine, A New Meroditerpene from An Indonesian Sponge *Haliclona* sp. *Chem. Pharm. Bull.* 59(10):1311-1313 .
- Trianto A., Ocky K.R., Agus S., Sakti I.M., Rachmat A., Sulistiowati, Septhy K. R., Phillip C. & Erin, M. 2019. Exploration Culturable Bacterial Symbionts of Sponges from Ternate Islands, Indonesia. *Biodiversitas.* 20 (3):776-782.
- Walsh, P.S., David A.M., & Russell H. 1991. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques* 10(4):506-513.
- Waluyo, L. 2007. Mikrobiologi Umum. Universitas Muhammadiyah Malang, Malang.
- Wang, X., Margaret I., Albert W. L., Zhengrong Y., Pan W., Baoting Z, ... & Chuanshan X. 2015. Sonodynamic Action of Curcumin on Foodborne Bacteria *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Ultrasonics*, 62:75-79.
- Wang, J., Pei S., Qiong G., Wei D.L. , Jia L. G. , Wei Q., Dan Q.F. & Sheng A.T. 2017. Antifouling Activity Against Bryozoan and Barnacle by Cembrane Diterpenes from The Soft Coral *Sinularia Flexibilis*. *Int. Biodeteriorat. Biodegradat.*, 120:97-103.
- Zazzaro D., Katya R. & Andrew J. 2018. Use of Extract from Adults of the Triangle Barnacle, *Balanus trigonus*, for Reducing Fouling in Mussel Farms. *Aquaculture*, 483:223-229.