

## Optimasi Kondisi Fermentasi pada Produksi Metabolit Antibakteri dari *Bacillus tequilensis* BSMF Simbiotik *Halichondria panicea*

### *Optimization of Fermentation Condition on Antibacterial Production from Bacillus tequilensis BSMF Symbiotic Halichondria panicea*

Nindya Pramesti Wardani<sup>1</sup>, Achmad Toto Poernomo<sup>2\*</sup>, Isnaeni<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Apoteker, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Ilmu Kefarmasian, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

\*Corresponding author: achmad-t-p@ff.unair.ac.id

Submitted: 6 Februari 2021

Accepted: 25 Mei 2021

Published: 29 Agustus 2021

#### **Abstract**

**Background:** Exploration of antibacterial substances from new sources such as plants, animals, and microorganisms, both living and symbiotic, is an alternative solution to overcome potential antibacterial needs. Microorganisms in bacteria are targeted as a sustainable source of antibacterial substances because of their ability to propagate easily. Bacteria living in symbiosis are known to produce antibacterial metabolites with a wider spectrum than whole-cell bacteria. They can symbiosis with various living things including multicellular organisms such as sponges. The isolate of *Bacillus tequilensis* BSMF symbiotic with *Halichondria panicea* from Cabbija Madura Coast has been reported to produce antibacterial metabolites. **Objective:** To determinate the pH and temperature on antibacterial metabolite production from *Bacillus tequilensis* BSMF symbiotic *Halichondria panicea* using Potato Dextrose Agar (PDA) media. **Methods:** The production of the antibacterial metabolites was carried out by solid fermentation method on PDA media with adjusted pH (5 - 8) and temperature (28, 32, 37°C) using *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Eschericia coli* ATCC 25922 as test bacteria. The antibacterial activity was determined by measuring the inhibition zone diameter. **Results:** The optimal pH media and incubation temperature *Bacillus tequilensis* BSMF antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Eschericia coli* ATCC 25922 were  $8 \pm 0.5$  and  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  respectively. The average antibacterial activity index against the test bacteria were  $2.74 \pm 0.07$  and  $3.39 \pm 0.07$  respectively. **Conclusion:** The production of antibacterial metabolites from *Bacillus tequilensis* BSMF could be performed optimally at pH  $8 \pm 0.5$  and  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**Keywords:** antibacterial metabolites, *Bacillus tequilensis* BSMF, *Halichondria panicea*, pH, temperature

#### **Abstrak**

**Pendahuluan:** Resistensi antibakteri merupakan masalah kesehatan global yang dialami hampir di seluruh negara. Eksplorasi antibakteri dari sumber baru seperti tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme baik yang hidup bebas maupun bersimbiosis menjadi solusi alternatif untuk mengatasi resistensi antibakteri. Mikroorganisme berupa bakteri ditargetkan sebagai sumber antibakteri yang berkelanjutan karena jumlahnya melimpah dan mudah dalam proses pembiakan. Bakteri yang hidup bersimbiosis diketahui dapat memproduksi metabolit antibakteri berspektrum lebih luas dibandingkan bakteri yang hidup bebas. Bakteri dapat bersimbiosis dengan berbagai makhluk hidup termasuk organisme multiseluler seperti spons. Isolat *Bacillus tequilensis* BSMF yang bersimbiosis dengan *Halichondria panicea* dari Perairan Cabbija Madura menunjukkan adanya produksi metabolit yang memiliki aktivitas antibakteri. **Tujuan:** Menentukan pH dan suhu optimum untuk produksi metabolit antibakteri dari *Bacillus tequilensis* BSMF simbiotik *Halichondria panicea*. **Metode:** Produksi metabolit antibakteri dilakukan dengan metode fermentasi padat pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang telah diatur pH dan suhu inkubasinya, sedangkan uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Eschericia*

*coli* ATCC 25922 dilakukan menggunakan metode difusi agar. Penentuan aktivitas antibakteri dilakukan melalui pengukuran diameter zona hambat. **Hasil:** pH media yang menunjukkan aktivitas antibakteri optimum *Bacillus tequilensis* BSMF terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Eschericia coli* ATCC 25922 adalah  $8 \pm 0,5$  pada suhu inkubasi  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  dengan rata-rata indeks aktivitas antibakteri berturut-turut  $2,74 \pm 0,07$  dan  $3,39 \pm 0,07$ . **Kesimpulan:** pH dan suhu optimum yang diperoleh adalah pH  $8 \pm 0,5$  dan suhu  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**Kata kunci:** *Bacillus tequilensis* BSMF, *Halichondria panicea*, metabolit antibakteri, pH, suhu

## PENDAHULUAN

Peningkatan bakteri patogen yang resisten terhadap antibakteri saat ini menyebabkan meningkatnya pula kebutuhan akan antibakteri baru. Bakteri yang resisten akan tahan terhadap efek bakterisidal maupun bakteristatik dari sediaan antibakteri sehingga efektivitasnya menurun (Hasan & Al-harmoosh, 2020). Eksplorasi sumber antibakteri baru dari mikroorganisme dapat menjadi jawaban dari persoalan tersebut. Eksplorasi terhadap biota yang ada di darat masih menjadi pilihan dibandingkan biota laut yang saat ini sedang dalam perkembangan (Cuadrat dkk., 2020). Potensi metabolit antibakteri dari laut perlu dikembangkan karena wilayah Indonesia 2/3 bagiannya adalah lautan salah satunya Perairan Madura. Perairan Madura dipilih sebagai daerah penelitian sebab memiliki kualitas perairan yang baik dan biota laut yang beragam diantaranya udang, ikan, dan spons (Browijoyo & Syifania, 2019).

Spons merupakan invertebrata dengan kerangka skeleton dan lapisan lunak seperti jeli. Kerangka skeleton ini tersusun dari silikat, kalsium karbonat, dan protein sedangkan lapisan lunak merupakan asam lemak, kolagen sebagai nutrisi bagi makhluk hidup lain (Rajendran, 2019). Oleh karena itu, mikroorganisme contohnya bakteri dapat bersimbiosis dengan spons. Bakteri yang hidup bersimbiosis diketahui dapat memproduksi metabolit antibakteri berspektrum lebih luas dibandingkan bakteri yang hidup bebas sehingga bakteri ditargetkan sebagai sumber antibakteri. Selain itu, bakteri tergolong dalam sumber antibakteri yang berkelanjutan karena jumlahnya melimpah dan mudah dalam proses pembiakan.

Penelitian sebelumnya (Damar, 2019) berhasil mengisolasi *Bacillus tequilensis* BSMF yang bersimbiosis dengan *Halichondria panicea* dari Perairan Cabbia Madura sehingga pada penelitian ini akan diuji apakah isolat tersebut memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Eschericia coli* ATCC 25922. Penelitian ini tergolong baru karena *B. tequilensis* BSMF diisolasi dari hasil simbiosis dengan spons perairan Madura.

Penelitian terkait uji aktivitas antibakteri *B. tequilensis* telah dilaporkan untuk isolat dari tanah dan air, sedangkan isolat dari spons di Indonesia belum dilaporkan. Kiran dkk. (2018) menguji aktivitas antimikroba pirolo[1,2-a] pirazin-1,4-dion yang diisolasi dari *B. tequilensis* MSI45 asal laut India. Protease alkali dari *B. tequilensis* ZMS-2 asal tanah Pakistan sebagai sumber antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* telah dilaporkan oleh (Khan dkk. 2019). Perbedaan karakteristik habitat tersebut akan mempengaruhi antibakteri yang dihasilkan.

Senyawa metabolit dengan aktivitas antibakteri dihasilkan oleh bakteri melalui proses fermentasi. Pembentukan metabolit antibakteri dalam prosesnya dipengaruhi oleh stabilitas enzim *Non Ribosomal Peptide Synthetase* (NRPS) dan *Polyketide Synthase* (PKS) sebagai biokatalisator yang menjembatani proses fermentasi. Faktor fisikokimia lingkungan yang dapat mempengaruhi kinerja enzim dalam bakteri juga akan mempengaruhi proses fermentasi untuk menghasilkan metabolit antibakteri (Lorío *et al.*, 2019). Faktor tersebut diantaranya pH media, suhu inkubasi, ketersediaan oksigen, dan waktu inkubasi. Melakukan optimasi pH media dan suhu inkubasi proses produksi menjadi penting untuk mendapatkan metabolit antibakteri secara optimum.

Pada penelitian ini, kondisi produksi metabolit antibakteri menggunakan media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Derajat keasaman media PDA diatur ke arah basa agar dapat digunakan untuk pertumbuhan bakteri (Yoghiapiscessa dkk., 2016). Media PDA dengan pH 5, 6, 7, 8 dan diinkubasi pada suhu  $28^\circ\text{C}$ ,  $32^\circ\text{C}$ , dan  $37^\circ\text{C}$  selama 72 jam sesuai hasil orientasi pada skala laboratorium yang menunjukkan pertumbuhan *B. tequilensis* BSMF optimum pada rentang tersebut.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Isolat *Bacillus tequilensis* BSMF simbiosis *Halichondria panicea* ini telah dilakukan dan diidentifikasi oleh Damar (2019). Bakteri tersebut diisolasi dari Perairan Desa Cabbia, Kecamatan

Talango, Kabupaten Sumenep, Madura pada koordinat 7°06'03.9" LS, 113°58'33.6" BT, media *Potato Dextrose Agar* digunakan sebagai media pertumbuhan dan media kultur persediaan, larutan NaCl p.a 0,9% (E. Merck), dapar fosfat KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dan K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> p.a (pH 5 - 8), media *Nutrient Agar* (Merck) untuk uji aktivitas antibakteri, bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diperoleh dari Unit Layanan Pengujian (ULP) Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

#### Alat

*Autoclave* (HL-340 series vertical type stream sterilizer), inkubator (*Memmet IN110®*), vortex (II IKA® Genius 3), spektrofotometer UV-Vis (Lambda EZ201 Perkin Elmer), pH meter (*Handylab pH 11 Schott®*), jangka sorong (*Sketmat Vernier Caliper Triangle 6 Brand*), dan timbangan digital (*Sartorius Type BP 22IS®*).

#### Metode

##### Peremajaan isolat *Bacillus tequilensis* BSMF

Langkah awal dalam peremajaan bakteri adalah dengan cara satu *Öse* isolat *B. tequilensis* BSMF diambil dari tabung reaksi dan digoreskan pada media PDA miring (*slant agar*) 10 mL. Media PDA dibuat dari larutan infusa 100 g kentang, 10 g agarosa, dan 9 g dekstrosa dalam 500 mL air suling. Selanjutnya, media PDA miring diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Atlas, 2010). Pertumbuhan koloni *B. tequilensis* BSMF yang terbentuk diamati.

##### Produksi biomassa *Bacillus tequilensis* BSM-F

Biomassa dibuat dari kultur *B. tequilensis* BSMF ditambahkan dengan larutan NaCl 0,9% kemudian dicampur dengan bantuan vortex hingga terbentuk suspensi. Sebanyak 100 µL suspensi isolat *B. tequilensis* BSMF (transmitan 25% pada panjang gelombang 580 nm) diambil menggunakan mikropipet. Jumlah bakteri yang hidup dihitung secara ALT (Angka Lempeng Total) minimal sejumlah 10<sup>6</sup> cfu/ ml dan dicampurkan pada 20 mL media PDA yang telah diatur menggunakan dapar fosfat 0,05 M menjadi pH 5, 6, 7, dan 8.

Pengukuran pH dilakukan menggunakan pH meter dengan replikasi 3 kali. Campuran media dan suspensi isolat *B. tequilensis* BSM-F divortex dan diinkubasi pada suhu 28°C, 32°C, dan 37°C selama 72 jam. Maka akan diperoleh biomassa sel yang akan menghasilkan metabolit. Metode produksi ini merupakan fermentasi padat (*solid state fermentation*) modifikasi dari El-Naggar dkk. (2009) menggunakan *plate agar*. Pada jam ke-72 dilakukan *sampling* untuk menguji aktivitas antibakteri.

#### Pengujian aktivitas antibakteri

Pada pengujian aktivitas antibakteri diperlukan media uji yang terdiri dari 2 lapis media *Nutrient Agar* yaitu 12 mL sebagai lapisan dasar atau *base layer* dan 8 mL *seed layer*. Lapisan atas yaitu 8 mL *seed layer* dibuat dari 3 µL suspensi bakteri uji yaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 BSM-F diukur persen transmisinya mencapai 25% transmitan pada panjang gelombang 580 nm dengan spektrofotometer visibel. Penggunaan transmitan 25% sesuai dipersyaratkan dalam Farmakope Indonesia VI yakni dikarenakan pada transmitan tersebut jumlah bakteri sekitar 10<sup>7</sup> - 10<sup>9</sup> cfu/mL sehingga apabila bakteri nantinya ditumbuhkan pada media, bakteri dapat mencapai fase logaritma dan dapat diamati (Kemenkes RI, 2020). Selanjutnya 100 µL suspensi bakteri diambil dengan pipet ke dalam 8 mL *Nutrient Agar* hangat dan dicampur dengan bantuan vortex kemudian, dituangkan diatas *base layer* hingga memadat.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar modifikasi (El-Naggar dkk., 2009). Pengujian dilakukan dengan cara menyiapkan media fermentasi yang telah ditumbuhi biomassa *B. tequilensis* BSMF, kemudian dicongkel menggunakan silinder pencetak berdiameter 7,50 mm dan diletakkan di atas permukaan media yang sudah diinokulasi dengan bakteri uji. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam dan diamati setiap 24 jam. Zona jernih yang tampak di sekitar agar yang mengandung koloni *B. tequilensis* BSMF diukur menggunakan jangka sorong.

Penentuan aktivitas antibakteri dinyatakan dalam zona hambat dan indeks aktivitas antibakteri. Zona hambat adalah daerah jernih disekitar koloni *B. tequilensis* BSMF akibat terhambatnya pertumbuhan bakteri uji oleh aktivitas antibakteri yang dihasilkan. Sedangkan indeks aktivitas antibakteri adalah nilai perbandingan antara diameter zona hambat dengan diameter koloni (Surjowardojo dkk. 2016).

$$\text{Indeks aktivitas} = \frac{\text{diameter zona hambat (mm)}}{\text{diameter koloni (mm)}}$$

#### Analisis uji statistik

Penelitian ini menggunakan variabel bebas berupa pH media PDA dan suhu produksi metabolit antibakteri. pH diatur menggunakan dapar fosfat 0,05 M menjadi pH 5, 6, 7, dan 8. Suhu inkubasi dilakukan pada 28°C, 32°C, dan 37°C. Setelah 72 jam diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Hasil

pengujian berupa indeks aktivitas antibakteri sebagai variabel tergantung yang diperoleh akan diolah berdasarkan uji statistik melalui aplikasi *IBM Statistical Package for the Social Sciens* (SPSS) versi 24 dengan metode *Two-way ANOVA* (*Analysis of Variance*) agar diketahui adanya perbedaan pH media dan suhu inkubasi pada proses produksi metabolit antibakteri yang optimum.

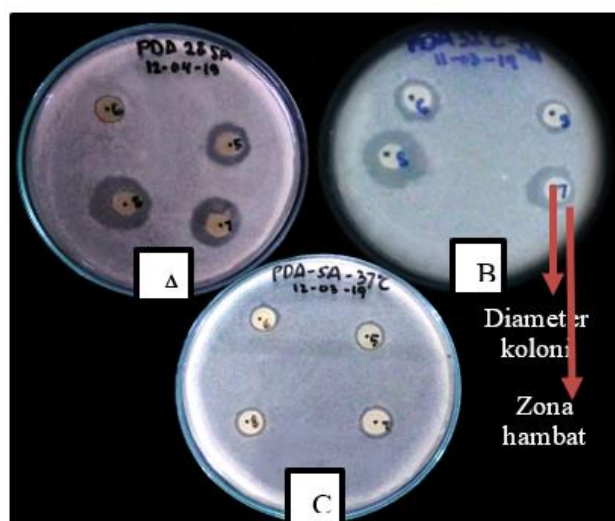
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, digunakan PDA yang mengandung sumber karbon berupa dekstrosa dan sumber nitrogen dalam infusa kentang sebagai media produksi metabolit antibakteri. Karbon merupakan sumber energi bagi bakteri untuk melakukan biosintesis metabolit, sedangkan nitrogen merupakan unsur penyusun asam amino pada biokatalisator pembentukan metabolit antibakteri seperti enzim NRPS dan PKS.

Metabolit yang dihasilkan isolat *B. tequilensis* BSMF simbiotik *Halichondria panicea* diuji aktivitas antibakterinya terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sebagai bakteri gram positif dan *Eschericia coli* ATCC 25922 sebagai bakteri gram negatif sehingga diperoleh antibakteri yang efektif menghambat bakteri gram positif maupun gram negatif.

### Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

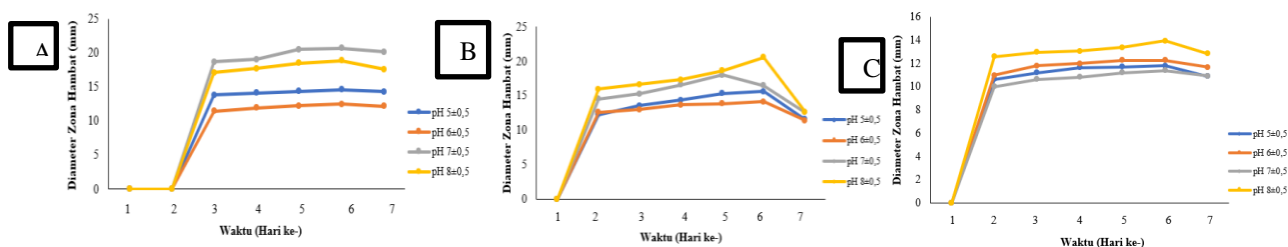
Aktivitas antibakteri dari *B. tequilensis* BSMF terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diamati tiap 24 jam dalam kurun waktu 7 hari. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dikatakan positif apabila terbentuk daerah jernih di sekitar koloni *B. tequilensis* BSMF (Gambar 1). Hal tersebut menunjukkan pertumbuhan bakteri uji terhambat sehingga disebut zona hambat. Zona hambat kemudian dihitung diameternya menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm.



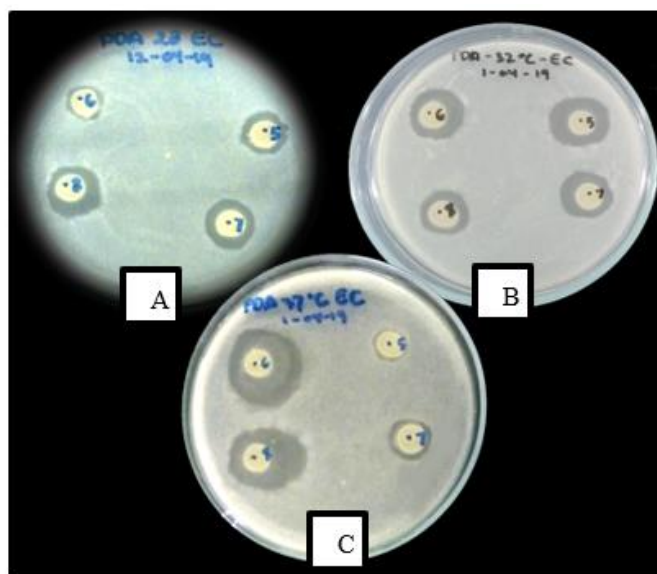
**Gambar 1.** Hasil pengamatan uji aktivitas antibakteri *Bacillus tequilensis* BSMF terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada media PDA pH  $5 \pm 0,5$ ;  $6 \pm 0,5$ ;  $7 \pm 0,5$ ; dan  $8 \pm 0,5$  suhu inkubasi  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  (A),  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  (B), dan  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  (C)

Pengamatan terhadap zona hambat sebagai indikasi aktivitas antibakteri dilakukan pada pH media 5 - 8 dan suhu inkubasi  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ , dan  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Suhu inkubasi tersebut menyesuaikan rentang suhu tumbuh bagi bakteri mesofil yaitu 25 -  $50^\circ\text{C}$  karena *B. tequilensis* BSMF termasuk bakteri mesofil. Pemilihan suhu merupakan salah satu parameter yang akan mempengaruhi kinerja enzim PKS dan NRPS untuk melakukan sintesis metabolit sekunder dengan aktivitas antibakteri (Moreira dkk., 2020). Suhu terlalu tinggi dapat mengakibatkan denaturasi sedangkan suhu yang terlampaui rendah akan menginaktivasi enzim.

Pada saat suhu inkubasi  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , zona hambat mulai terbentuk di sekitar koloni setelah 3 hari (72 jam), sedangkan ketika suhu  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  dan  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  zona hambat terbentuk setelah 2 hari (48 jam). Ukuran diameter zona hambat terus meningkat selama 6 hari (144 jam) dan mulai menurun setelah 7 hari (168 jam) (Gambar 2). Berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hambat tersebut, dapat diketahui aktivitas antibakteri isolat *B. tequilensis* BSMF pada suhu inkubasi  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ , dan  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  mencapai maksimal setelah 6 hari (144 jam).



**Gambar 2.** Profil aktivitas antibakteri *Bacillus tequilensis* BSMF terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (A = suhu  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ; B = suhu  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ ; C = suhu  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ )



**Gambar 3.** Hasil pengamatan uji aktivitas antibakteri *Bacillus tequilensis* BSMF terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media PDA pH  $5 \pm 0,5$ ;  $6 \pm 0,5$ ;  $7 \pm 0,5$ ; dan  $8 \pm 0,5$  suhu inkubasi  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  (A),  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  (B), dan  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  (C)

Data hasil pengukuran diameter zona hambat maksimum yaitu setelah 6 hari (144 jam) dipergunakan untuk memperoleh nilai indeks aktivitas antibakteri isolat *B. tequilensis* BSMF terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Nilai indeks aktivitas antibakteri diperoleh melalui pembagian antara diameter zona hambat dengan diameter koloni isolat (7,50 mm).

Berdasarkan hasil perhitungan indeks aktivitas antibakteri, saat suhu inkubasi  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  aktivitas

antibakteri tertinggi dari isolat *B. tequilensis* BSMF terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 terjadi pada pH  $7 \pm 0,5$  sedangkan saat suhu  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  dan  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  tertinggi pada pH 8 (Tabel 1) namun belum dapat ditentukan pH dan suhu yang optimum sehingga selanjutnya dilakukan analisis melalui pengujian statistik.

**Tabel 1.** Indeks aktivitas antibakteri isolat *Bacillus tequilensis* BSMF terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 di hari ke-6

pH media PDA	Indeks Aktivitas Antibakteri		
	Suhu $28 \pm 1^\circ\text{C}$	Suhu $32 \pm 1^\circ\text{C}$	Suhu $37 \pm 1^\circ\text{C}$
pH $5 \pm 0,5$	$1,95 \pm 0,08$	$2,08 \pm 0,07$	$1,58 \pm 0,05$
pH $6 \pm 0,5$	$1,66 \pm 0,06$	$1,89 \pm 0,02$	$1,64 \pm 0,03$
pH $7 \pm 0,5$	$2,76 \pm 0,05$	$2,20 \pm 0,12$	$1,52 \pm 0,07$
pH $8 \pm 0,5$	$2,49 \pm 0,06$	$2,74 \pm 0,07$	$1,86 \pm 0,07$

Hasil uji *Two-way* ANOVA memberikan nilai  $F = 39,348 > F$  tabel (3,28) dan nilai signifikan  $= 0,000 < \alpha = 0,05$  menunjukkan ada perbedaan indeks aktivitas antibakteri antara kelompok pH media dan suhu

inkubasi. pH dan suhu yang memiliki pengaruh terbesar pada aktivitas antibakteri *B. tequilensis* BSMF terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diuji melalui *Post*

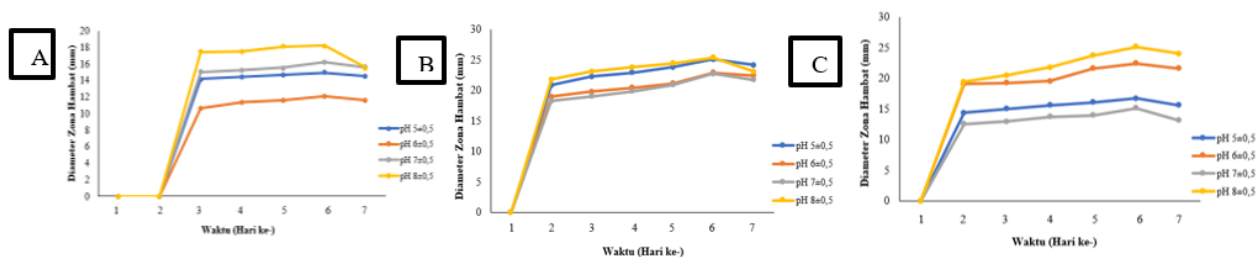
Hoc Multiple Comparisons diperoleh mean difference terbesar pada pH 8,0 dan suhu  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Eschericia coli* ATCC 25922**

Pengamatan aktivitas antibakteri isolat *B. tequilensis* BSMF terhadap *Eschericia coli* ATCC 25922 dilakukan setiap 24 jam selama 7 hari. Aktivitas antibakteri berupa ukuran diameter zona hambat dibandingkan pada berbagai kondisi pengaturan suhu inkubasi ( $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) dan pH media (5,6,7,8) seperti pada Gambar 3. Rentang pH media yang digunakan disesuaikan pH produksi metabolit antibakteri dari *Bacillus* sp. seperti penelitian yang dilakukan Afriyanto dkk. (2019) yaitu pada pH 5 – 9. Kondisi pH yang terlampau asam atau basa dapat menghambat metabolisme sel bakteri melalui mekanisme kesetimbangan gradien konsentrasi  $[\text{H}^+]$

pada transpor membran. Hal ini akan berpengaruh terhadap pertumbuhan dan pembentukan metabolit antibakteri.

Pada ketiga suhu inkubasi yaitu  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ , dan  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  zona hambat terbentuk setelah 2 hari (48 jam). Ukuran dari diameter zona hambat semakin meningkat sampai hari ke-6 (144 jam). Ukuran diameter zona hambat yang meningkat maka aktivitas antibakteri juga semakin meningkat. Setelah 7 hari (168 jam), terjadi penurunan diameter zona hambat seperti tampak pada Gambar 4. Penurunan dapat berlangsung sebab pertumbuhan *B. tequilensis* BSMF telah memasuki *death phase* yakni fase ketika bakteri yang hidup jumlahnya lebih sedikit dibandingkan bakteri yang mati, akibatnya metabolit antibakteri yang diproduksi menurun sehingga mengakibatkan diameter zona hambat menurun pula.



**Gambar 4.** Profil aktivitas antibakteri *Bacillus tequilensis* BSMF terhadap *Eschericia coli* ATCC 25922 (A = suhu  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ; B = suhu  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ ; C = suhu  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ )

Berdasarkan data yang diperoleh, dapat diketahui antibakteri dari *B. tequilensis* BSMF memiliki daya hambat kuat terhadap *Eschericia coli* ATCC 25922 dengan rata-rata diameter zona hambat  $12,12 \pm 0,30 - 25,38 \pm 0,56$  mm sebab Surjowardojo dkk. (2016) menyatakan diameter zona hambat 11 – 20 mm merupakan salah satu parameter daya hambat yang poten. Data pada hari ke-6 (144 jam) diolah untuk memperoleh nilai indeks aktivitas antibakteri isolat *B. tequilensis* BSMF terhadap *Eschericia coli* ATCC 25922. Nilai indeks aktivitas antibakteri diperoleh

melalui pembagian antara diameter zona hambat dengan diameter koloni isolat (7,50 mm).

Hasil perhitungan indeks aktivitas antibakteri tampak pada Tabel 2. Nilai indeks berbanding lurus dengan zona hambat sehingga semakin tinggi indeks maka semakin besar zona hambat sehingga potensi aktivitas antibakteri semakin tinggi. Aktivitas antibakteri tertinggi dari isolat *B. tequilensis* BSMF terhadap *Eschericia coli* ATCC 25922 terjadi pada pH media  $8 \pm 0,5$  dengan suhu inkubasi  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ . Penentuan pH dan suhu yang optimum dilakukan melalui analisis uji statistik.

**Tabel 2.** Indeks aktivitas antibakteri isolat *Bacillus tequilensis* BSMF terhadap *Eschericia coli* ATCC 25922 di hari ke-6

pH media PDA	Indeks Aktivitas Antibakteri		
	Suhu $28 \pm 1^\circ\text{C}$	Suhu $32 \pm 1^\circ\text{C}$	Suhu $37 \pm 1^\circ\text{C}$
pH $5 \pm 0,5$	$2,00 \pm 0,03$	$3,34 \pm 0,09$	$2,23 \pm 0,03$
pH $6 \pm 0,5$	$1,62 \pm 0,03$	$3,06 \pm 0,02$	$2,99 \pm 0,03$
pH $7 \pm 0,5$	$2,17 \pm 0,05$	$3,04 \pm 0,06$	$2,02 \pm 0,04$
pH $8 \pm 0,5$	$2,43 \pm 0,07$	$3,39 \pm 0,07$	$3,36 \pm 0,05$

Hasil uji *Two-way* ANOVA memberikan nilai  $F = 142,244 > F$  tabel (3,28) dan nilai signifikan = 0,000 <  $\alpha = 0,05$  menunjukkan ada perbedaan indeks aktivitas antibakteri antara kelompok pH media dan suhu inkubasi. pH dan suhu yang memiliki pengaruh terbesar pada aktivitas antibakteri *B. tequilensis* BSMF terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 diuji melalui *Post Hoc Multiple Comparisons* diperoleh *mean difference* terbesar pada pH 8,0 dan suhu  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ . Sehingga berdasarkan hasil analisa statistik menunjukkan terdapat pengaruh antara pH dan suhu terhadap aktivitas antibakteri isolat *B. tequilensis* BSMF terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

## KESIMPULAN

Sesuai hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa *B. tequilensis* BSMF simbiotik *Halichondria panicea* asal Perairan Desa Cabbiya Madura dapat memproduksi metabolit yang memiliki aktivitas antibakteri. Kondisi pH media dan suhu inkubasi optimum dalam proses produksi metabolit antibakteri isolat *B. tequilensis* BSMF pada media PDA yaitu pada pH  $8 \pm 0,5$  serta suhu  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ . Penelitian selanjutnya dapat dilakukan purifikasi dan identifikasi senyawa aktif metabolit antibakteri yang dihasilkan *B. tequilensis* BSMF.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afriyanto, R., Radjasa, S. K. & Crews, P. (2019). Exploration Culturable Bacterial Symbionts of Sponges from Ternate Islands Indonesia. *Biodiversitas*; 20; 776–782.
- Atlas, R. (2010). Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition. Washington D.C: CRC Press.
- Browijoyo, M. & Syifania, S. (2019). Water Quality in The North Madura : Is It Suitable For Vannamei Shrimp Farming or Not?. *Aquasains*; 8; 753–758.
- Cuadrat, R. R. C., Sorokina, M.A., Andrade, M.R.D., Bruno G. & Goris, T. (2020). Global Ocean Resistome Revealed: Exploring Antibiotic Resistance Gene Abundance and Distribution in TARA Oceans Samples. *Giga Science Oxford*; 9; 1–12.
- Damar, G. (2019). Penapisan dan Identifikasi Bakteri Laut Penghasil Antibakteri Simbiotik *Halichondria panicea* dari Pantai Cabbiya Madura dengan Analisis Gen 16S rRNA. *Skripsi*; Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- El-Naggar, M. Y., El-Assar, S. A. & Abdul-Gawad, S. M. (2009). Solid-state Fermentation for the Production of Meroparamycin by *Streptomyces* sp. strain MAR01. *Journal of Microbiology and Biotechnology*; 19; 468–473.
- Hasan, T. H. & Al-harmoosh, R. A. (2020). Mechanisms of Antibiotics Resistance in Bacteria. *Systematic Review Pharmacy*; 11; 817–823.
- Kemendes RI (2020). Farmakope Indonesia VI. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Khan, Z., Shafique, M. & Nawaz, H. R. (2019). *Bacillus tequilensis* ZMS-2: A Novel Source of Alkaline Protease with Antimicrobial, Anti-coagulant, Fibrinolytic and Dehairing Potentials. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*; 32; 1913–1918.
- Kiran, G. S., Priyadharsini, S. & Sajayan, A. (2018). An Antibiotic Agent Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, Hexahydro Isolated from A Marine Bacteria *Bacillus tequilensis* MSI45 Effectively Controls Multi-drug Resistant *Staphylococcus aureus*. *Royal Society of Chemistry Advances*; 8; 17837–17846.
- Lorío, L. U., Alió, C. P., Brenes-guillén, L. A. & Walter, H. M. (2019). The Influence of Temperature and pH on Bacterial Community Composition of Microbial Mats in Hot Springs from Costa Rica. *Microbiology Open*; 8; 1–26.
- Moreira, S. M., Mendes, T. A., Oliveira S., Mateus, F. H., Sharon, A. C., Christopher J. & Mantovani, H. C. (2020). Genomic and Gene Expression Evidence of Nonribosomal Peptide and Polyketide Production Among Ruminant Bacteria: A Potential Role in Niche Colonization?. *FEMS Microbiology Ecology*; 96; 107–120.
- Rajendran, S. (2019). Marine Sponges: Repositories of Bioactive Compounds with Medicinal. *International Journal of Chemical Technology Research*; 12; 26–48.
- Surjowardojo, P., Susilorini, T. E. & Benarivo, V. (2016). Daya Hambat Dekok Kulit Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Streptococcus agalactiae* Penyebab Mastitis pada Sapi Perah. *Jurnal Ternak Tropika*; 17; 11–21.
- Yoghiapiscessa, D., Batubara, I. & Wahyudi, A. T. (2016). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Bacterial Extracts from Marine Bacteria Associated with Sponge *Stylorella* sp. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*; 12; 36–46.