

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI PROTEIN DAN PEPTIDA BIOAKTIF
DARI BAKTERI SIMBION EKSOFIT DAN ENDOFIT
ALGA MERAH *Eucheuma cottonii***

*ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST IN PROTEIN AND BIOACTIVE
PEPTIDES FROM EXOPHYTIC AND ENDOPHYTIC SYMBIONT
BACTERIA RED ALGAE *Eucheuma cottonii**

**MARINDA
H012182001**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI PROTEIN DAN PEPTIDA BIOAKTIF
DARI BAKTERI SIMBION EKSOFIT DAN ENDOFIT
ALGA MERAH *Eucheuma cottonii***

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Kimia

Disusun dan diajukan oleh :

MARINDA

Kepada

**PROGAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

TESIS

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI PROTEIN DAN PEPTIDA BIOAKTIF DARI
BAKTERI SIMBION EKSOFIT DAN ENDOFIT ALGA MERAH *Eucheuma
cottonii***

Disusun dan diajukan oleh :

MARINDA

Nomor Pokok : H012182001

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

Pada Tanggal 13 Januari 2021

Dan dinyatakan telah memenuhi isyarat

Menyetujui,
Komisi Penasehat



Dr. Hasnah Natsir, M. Si
Ketua



Prof. Dr. Ahyar Ahmad
Anggota

Ketua Program Studi
Magister Kimia



Dr. Hasnah Natsir, M.Si

Dekan Fakultas MIPA
Universitas Hasanuddin,



Dr. Eng. Amiruddin, M.Si

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Marinda
Nomor Mahasiswa : H012182001
Program Studi : Kimia

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 29 Januari 2021

Yang Menyatakan



Marinda

PRAKATA

Alhamdulillah, segala puji dan syukur kepada Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya, serta kelapangan yang diberikan kepada penulis sehingga penyusunan Tesis dengan judul **"Uji Aktivitas Antibakteri Protein dan Peptida Bioaktif dari Bakteri Symbion Eksofit dan Endofit Alga Merah *Eucheuma cottonii*"** dapat terselesaikan sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister pada Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa banyak kesulitan dan hambatan yang ditemui, mulai dari tahap perencanaan sampai penyusunan Tesis ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan ucapan terima kasih sebesar-besarnya kepada ibu Dr. Hasnah Natsir, M. Si dan bapak Prof. Dr. Ahyar ahmad, selaku dosen pembimbing. Semoga ilmu yang diberikan dapat menjadi amal jariyah bagi beliau.

Pada kesempatan kali ini penulis juga menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, M.A, selaku Rektor Universitas Hasanuddin
2. Prof. Dr. Ir. Jamaluddin, M.Sc, selaku Dekan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin
3. Dr. Eng. Amiruddin, M.Si, selaku dekan fakultas FMIPA Universitas Hasanuddin

4. Prof. Dr. Abd. Wahid Wahab, M.Sc, Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, M.S dan Dr. Siti Fauziah, M.Si selaku komisi penilai, terima kasih atas masukan yang diberikan
5. Bapak dan Ibu dosen kimia Pascasarjana UNHAS serta seluruh staff fakultas MIPA UNHAS, terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya.
6. Saudara-saudariku: Nurdin, S.T, Rusna, S.Si, Risna, S.Si, Rosda, S.E, Rosdiana, S.T dan Nirmalasari, S.Pd., M.Si yang selalu memberikan doa dan dukungan kepada penulis
7. Teman-teman seperjuangan di Laboratorium Biokimia dan angkatan 2018 Kimia yang telah membantu dan memberi dorongan selama proses penyusunan tesis.

Terkhusus tulisan ini penulis memberikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang tak terhingga kepada orangtua tercinta Hj. Rahma dan H. Nonci, yang telah memberikan kasih sayang tiada hentinya kepada penulis. Amanah dan kepercayaan serta doa yang selalu menjadi inspirasi dari penulis.

Penulis menyadari bahwa Tesis ini masih memiliki kekurangan. Untuk itu kritik dan saran yang sifatnya membangun demi kesempurnaan sangat penulis harapkan.

Makassar, 29 Januari 2021

Penulis

ABSTRAK

MARINDA. Uji Aktivitas Antibakteri Protein dan Peptida Bioaktif dari Bakteri Simbion Eksofit dan Endofit Alga Merah *Eucheuma cottonii* (dibimbing oleh Hasnah Natsri dan Ahyar Ahmad).

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antibakteri pada protein dan peptida bioaktif dari bakteri endofit dan eksofit simbion alga merah *E. cottonii*, serta menentukan pengaruh perbedaan kisaran berat molekul peptida bioaktif terhadap aktivitasnya. Tahapan penelitian ini meliputi peremajaan dan produksi bakteri simbion endofit dan eksofit alga merah *E. cottonii*, isolasi dan pemurnian protein, hidrolisis, ultrafiltrasi, serta uji aktivitas antibakteri pada *S. aureus* dan *E. coli*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein bioaktif dari bakteri endofit dan eksofit simbion alga merah *E. cottonii* memiliki diameter zona hambat tertinggi pada DA4 dan DB4 yaitu sebesar 12,53 mm dan 10,66 mm terhadap *E. coli*. Sedangkan aktivitas antibakteri peptida bioaktifnya menunjukkan diameter zona hambat tertinggi pada kisaran berat molekul < 3 kDa yaitu sebesar 15,2 mm dan 17,1 mm terhadap *E. coli*, serta 22 mm dan 21,8 mm terhadap *S. aureus*. Terdapat pengaruh perbedaan kisaran berat molekul peptida bioaktif terhadap aktivitas antibakterinya, semakin kecil berta molekul dari suatu peptida bioaktif, maka aktifitasnya semakin meningkat.

Kata Kunci: Bakteri Simbion, *E. cottonii*, Protein, Peptida Bioaktif, Antibakteri

ABSTRACT

MARINDA. Antibacterial Activity Test in Protein and Bioactive Peptides from Exophytic and Endophytic Symbiont Bacteria Red Algae *Eucheuma cottonii* (supervised by Hasnah Natsri and Ahyar Ahmad).

This study aims to determine antibacterial activity in protein and bioactive peptides from endophytic and exophytic symbiont bacteria red algae *E. cottonii* and to determine the effect of different molecular weight ranges of bioactive peptides on its activity. This research includes rejuvenation and production of endophytic and exophytic symbiont bacteria red algae *E. cottonii*, isolation and purification of the protein, hydrolysis, ultrafiltration, and antibacterial activity test on *S. aureus* and *E. coli*. The result showed that the bioactive protein from endophytic and exophytic symbiont bacteria red algae *E. cottonii* had the highest inhibition zone diameter in DA4 and DB4, namely 12,53 mm and 10,66 mm against *E. coli*. Whereas the antibacterial activity of bioactive peptides showed that the highest inhibition zone diameter in the molecular weight range < 3 kDa, namely 15,2 mm and 17,1 mm against *E. coli*, while against the *S. aureus* bacteria is 22 mm and 21,8 mm. There is an effect of differences in the molecular weight range of bioactive peptides on their antibacterial activity, the smaller the molecular weight of a bioactive peptides, the more its activity increases.

Keywords: Symbiont Bacteria, *E. cottonii*, Protein, Bioactive Peptides, Antibacterial

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGANTAR	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iv
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	6
C. Tujuan Penelitian	6
D. Manfaat Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	8
A. Protein dan Proses Hidrolisisnya	8
1. Protein	8

2. Hidrolisis Protein	9
B. Peptida Bioaktif	11
C. Peptida Sebagai Bahan Antibakteri	13
D. Alga Merah (<i>Eucheuma cottonii</i>)	15
E. Bakteri Simbion	18
F. Isolasi bakteri	19
1. Cara Penunangan (<i>Pour Plate</i>)	20
2. Cara Penyebaran (<i>Spread Plate</i>)	21
3. Cara Penggoresan (<i>Streak Culture</i>)	21
G. Ultrafiltrasi	22
H. Uji Antibakteri	23
1. Metode <i>Kirby and Bauer</i> (Kertas Cakram)	24
2. Cara Parit (<i>Ditch-plate technique</i>)	24
3. Cara Sumuran (<i>Hole/Cup-plate technique</i>)	25
4. Metode <i>E-test</i> (Epsilometer)	25
I. Kerangka Pikir	25
J. Hipotesis Penelitian	28
BAB III METODE PENELITIAN	29
A. Waktu dan Tempat	29
B. Alat dan Bahan	29
1. Alat	29
2. Bahan	30
C. Rancangan Penelitian	30

D. Prosedur Kerja	31
1. Pembuatan Media	31
2. Pembuatan Reagen	32
3. Peremajaan Bakteri Simbion Alga Merah	33
4. Starter Inokulum	33
5. Penentuan Waktu Produksi Optimum dan Pengukuran Kurva Pertumbuhan Bakteri	34
6. Isolasi Protein	34
7. Pemurnian Protein	35
8. Penentuan Kadar Protein	36
9. Hidrolisis Protein	36
10. Derajat Hidrolisis	37
11. Ultrafiltrasi	37
12. Uji Aktivitas Antibakteri	38
E. Analisis Data	39
1. Penentuan Kadar Protein	39
2. Penentuan Derajat Hidrolisis	39
BAB IV HASIL PENELITIAN	40
A. Peremajaan Bakteri Simbion Alga Merah <i>E. cottonii</i>	40
B. Penentuan Waktu Produksi Optimum dan Pertumbuhan Bakteri Endofit dan Eksofit Simbion	41
C. Isolasi dan Pemurnian Protein Bioaktif dari Bakteri Endofit dan Eksofit Simbion	44
1. Isolasi Protein Bioaktif	44
2. Fraksinasi Amonium Sulfat dan Dialisis	45

D. Hidrolisis Enzimatis Protein Bioaktif	51
1. Penentuan Waktu Optimum dan Derajat Hidrolisis	52
E. Ultrafiltrasi dengan Membran MWCO	55
F. Uji Aktivitas Antibakteri	56
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	71
A. Kesimpulan	71
B. Saran	71
DAFTAR PUSTAKA	72
LAMPIRAN	80

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1.	Enzim Proteolitik Spesifik	11
2.	Aktivitas Peptida Bioaktif dari Berbagai Sumber	15
3.	Komposisi Kimia Alga Merah <i>Eucheuma cottonii</i>	17
4.	Kadar Protein Bioaktif Bakteri Endofit Simbion <i>C. freundii</i>	48
5.	Kadar Protein Bioaktif Bakteri Eksofit Simbion <i>Enterobacter</i>	49
6.	Kadar Protein dari Peptida Bioaktif Hasil Ultrafiltrasi	56
7.	Aktivitas Antibakteri Pada Protein Bioaktif Bakteri Endofit <i>C. freundii</i> dan Bakteri Eksofit <i>Enterobacter</i>	59
8.	Aktivitas Antibakteri Pada Hidrolisat Protein Bakteri Endofit <i>C. freundii</i> dan Bakteri Eksofit <i>Enterobacter</i>	62
9.	Aktivitas Antibakteri pada Peptida Bioaktif Bakteri Endofit <i>C. freundii</i> dan Bakteri Eksofit <i>Enterobacter</i>	64
10.	Hasil Penelitian Mengenai Protein dan Peptida	70

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Protein	9
2. Alga Merah (<i>Eucheuma cottonii</i>)	17
3. Ilustrasi Mekanisme Pemisahan dengan Membran MWCO	23
4. Kerangka Pikir Penelitian	27
5. Isolat Bakteri Simbion Alga Merah	41
6. Kurva Perumbuhan Isolat Bakteri Endofit Simbion <i>C. freundii</i>	41
7. Kurva Perumbuhan Isolat Bakteri Eksofit Simbion <i>Enterobacter</i>	42
8. Hubungan Waktu Hidrolisis dengan Derajat Hidrolisis pada Protein Bioaktif Bakteri Endofit <i>C. freundii</i> dan Eksofit <i>Enterobacter</i>	53
9. Struktur Dinding Sel Bakteri Gram Negatif dan Gram Positif	58
10. Perbandingan Diameter Zona Hambat Protein Bioaktif dan Hidrolisat Protein	63
11. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Peptida Bioaktif Terhadap Bakteri <i>S. aureus</i> .	66
12. Mekanisme Kerja Peptida Bioaktif	69

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1.	Tahapan Penelitian	80
2.	Skema Penelitian	81
3.	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{\max})	91
4.	Kurva Standar Bovine Serum Albumin pada λ 660 nm	91
5.	Penentuan Waktu Produksi Optimum dan <i>Optical density</i> (OD) Bakteri Endofit dan Eksofit	92
6.	Fraksinasi dengan Amonium Sulfat	94
7.	Perhitungan Derajat Hidrolisis	96
8.	Kadar Protein Tiap Peptida Berdasarkan Perbedaan Bobot Molekul	97
10.	Dokumentasi Penelitian	98

DAFTAR SIMBAOL DAN SINGKATAN

Lambang/Singkatan	Arti dan Keterangan
AMPs	<i>Antimicrobial peptides</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<i>C.freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
Da	Dalton
DH	Derajat Hidrolisis
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. cottonii</i>	<i>Eucheuma cottonii</i>
kDa	KiloDalton
MHA	Muller Hinton Agar
MWCO	<i>Molecul Weight Cut Off</i>
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
OD	<i>Optical density</i>
rpm	Kecepatan putaran tiap menit
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TCA	<i>Trichloracetic acid</i>

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan yang memiliki wilayah laut yang sangat luas dan kaya akan sumber keanekaragaman hayati. Salah satu sumberdaya hayati yang cukup potensial adalah alga. Alga merupakan salah satu komoditas laut yang banyak dijumpai dalam perdagangan dunia karena pemanfaatannya yang luas dalam kehidupan sehari-hari, baik sebagai sumber pangan, obat-obatan, kosmetik dan bahan baku industry (Hendri *et al.*, 2017). Perairan laut Indonesia didominasi oleh tumbuhan alga merah (*Rhodophyceae*) sebanyak 452 jenis. Selain itu, terdapat sekitar 196 jenis alga hijau (*Chlorophyceae*) dan sekitar 134 jenis alga coklat (*Phaeophyceae*) (Pakidi, 2016).

Alga merah merupakan jenis alga yang paling banyak mengandung metabolit primer dan sekunder jika dibandingkan dengan alga hijau dan coklat. Salah satu jenis alga merah yang potensial dan banyak dijumpai di perairan Indonesia adalah alga merah *Eucheuma cottonii*. Alga ini mengandung polisakarida, protein, hormon, vitamin dan mineral. Selain itu, terkandung pula senyawa bioaktif yang dapat digunakan sebagai antibakteri, antivirus, antijamur, sitotoksik, dan lainnya (Yulianti *et al.*, 2018). Beberapa alga telah dilaporkan menunjukkan aktivitas antibakteri,

salah satu diantaranya adalah kelompok alga merah terutama dari genus *Eucheuma* (Abubakar *et al.*, 2011; Sihombing *et al.*, 2018).

Organisme yang hidup di laut pada umumnya bersimbion dengan bakteri, bahkan alga merah diketahui paling banyak bersimbion dengan bakteri. Keberadaan bakteri simbion umumnya melindungi dirinya dan biota inangnya dengan menghasilkan metabolit sekunder yang berfungsi untuk pertahanan diri organisme tersebut. Bakteri simbion identik dengan inangnya, sehingga memungkinkan metabolit sekunder maupun primer dari bakteri simbion alga merah *E. cottonii* memiliki karakteristik yang sama dengan inangnya (Rahmayanti *et al.*, 2019).

Pemanfaatan metabolit sekunder pada alga, misalnya sebagai bahan bioaktif dapat menyebabkan kepunahan jenis-jenis alga tertentu. Pemanfaatan bakteri simbion alga menjadi salah satu solusi yang paling baik dalam mengeksploitasi bahan bioaktif yang dihasilkan akibat simbiosis mutualisme. Penggunaan bakteri simbion alga sebagai bahan penelitian juga lebih menguntungkan dibandingkan dengan penggunaan alga karena pertumbuhan bakteri mudah dikontrol dan dapat diperbanyak dalam waktu yang cepat serta jumlah sampel yang dibutuhkan sedikit (Abubakar *et al.*, 2011; Yulianti *et al.*, 2018).

Senyawa bioaktif yang potensial untuk dikembangkan salah satu diantaranya peptida bioaktif. Peptida bioaktif merupakan senyawa turunan protein yang mempunyai manfaat kesehatan baik pencegahan maupun pengobatan (Susanto, 2019). Penggunaan protein sebagai bahan baku

obat menunjukkan bioaktivitas yang lemah. Aktivitas protein dapat ditingkatkan dengan memodifikasi protein melalui proses hidrolisis menjadi senyawa peptida (Mantalvao, 2016). Beberapa peptida secara biologi aktif dan berguna untuk meningkatkan status kesehatan manusia dan hewan yang biasa disebut sebagai peptida bioaktif.

Peptida bioaktif dapat diperoleh melalui hidrolisis enzimatis dan kimiawi. Hidrolisis enzimatis lebih banyak dipilih karena lebih mudah dan sederhana, dapat mengurangi resiko kerusakan pada asam amino serta enzim bekerja lebih spesifik dalam memotong rantai peptida pada protein (Fan *et al.*, 2014). Hidrolisis enzimatis protein menjadi peptida dapat menggunakan enzim protease, salah satunya yaitu enzim pepsin. Penggunaan enzim pepsin dalam menghidrolisis protein menjadi peptida lebih baik karena spesifik terhadap rantai samping hidrofobik dan aromatik, seperti fenilalanin, triptofan, dan tirosin. Karakteristik peptida yang memiliki aktivitas antibakteri memiliki komponen asam amino yang bersifat hidrofobik dan aromatik.

Peptida bioaktif memiliki potensi yang tinggi untuk dijadikan sebagai bahan baku obat karena mempunyai banyak manfaat, antara lain antioksidan, antimikroba, sebagai senyawa opioid, pengikat mineral, dan sebagai immunomodulator (Susanto, 2019).

Kemajuan teknologi dan metode analisis yang ada memfasilitasi penemuan dan identifikasi peptida baru yang berpotensi untuk pengobatan (Fosgerau dan Hoffmann, 2015). Peptida bioaktif diprediksi

dapat menjadi obat masa depan dengan peningkatan aktivitas fisiologi pada manusia dan hewan menggunakan teknologi molekuler dan bioinformatika yang telah tersedia (Hou *et al.*, 2017). Beberapa tahun terakhir penggunaan antibiotik yang dinilai belum mampu untuk mencegah kecepatan resisten bakteri menjadi perhatian para peneliti dibidang kesehatan. Penggunaan peptida sebagai antimikroba dinilai semakin menarik menggantikan fungsi antibiotik karena penggunaannya yang lebih aman bagi tubuh.

Salah satu masalah dalam dunia kesehatan disebabkan oleh bakteri patogen. Upaya yang dibutuhkan untuk mengatasi bakteri patogen penyebab penyakit dibutuhkan obat antibiotik. Penggunaan antibiotik yang tidak rasional dapat menyebabkan resistensi. Resistensi merupakan kemampuan bakteri dalam menetralkan dan melemahkan daya kerja antibiotik (Mardiah, 2017; Yulia., *et al.*, 2019). Pencarian bahan alami yang memiliki antibakteri dilakukan untuk mencegah, memperlambat atau menekan pertumbuhan bakteri patogen. Salah satu bahan alam yang potensial untuk dijadikan bahan baku obat adalah biota laut seperti alga (Trianto, *et al.*, 2004).

Andriani, *et al.*, (2015) telah menguji daya hambat ekstrak kasar alga merah *E. cottonii* terhadap bakteri patogen *S. aureus* dan *E. coli*. Ekstrak metanol ini mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji pada konsentrasi 4% dengan diameter daya hambat terbesar pada *S. aureus* adalah 7,85 mm sedangkan *E. coli* dengan diameter hambatan sebesar

6,25 mm. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Kosasi, *et al.*, (2019) menunjukkan bahwa bakteri yang bersimbion dengan permukaan alga dari jenis *Bacillus* dilaporkan menunjukkan aktivitas antibakteri pada *S. aureus* dan *E. coli* dengan daya hambat 7,33 mm dan 6,67 mm.

Hasil penelitian Sartika, *et al.*, (2013) juga menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri tertinggi pada fraksi protein 0-20% dengan daya hambat 10,00 mm dan 11,39 mm terhadap *S. aureus* dan *E. coli* yang diperoleh dari bakteri simbion *Sargassum sp.* Hasil penelitian Hamzah, *et al.*, (2018) melaporkan bahwa bakteri simbion endofit pada alga merah *Bacillus mycooides* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli* dengan rata-rata diameter zona hambat nya 9,8 mm dan 11,75 mm.

Penelitian mengenai ekstrak alga merah, bakteri yang bersimbion pada alga merah dan protein pada alga merah *E. cottonii* sebagai antibakteri telah dilaporkan. Namun, penelitian mengenai peptida bioaktif dari bakteri simbion alga merah *E. cottonii* belum pernah dilaporkan sebagai antibakteri.

Berdasarkan uraian tersebut maka pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antibakteri pada peptida bioaktif dari bakteri simbion alga merah *E. cottonii*. Penentuan aktivitas antibakteri dari peptida bioaktif diuji terhadap bakteri uji *S. aureus* (gram positif) dan *E. coli* (gram negatif).

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana aktivitas antibakteri protein bioaktif dari bakteri endofit dan eksofit simbion alga merah *E. cottonii* ?
2. Bagaimana aktivitas antibakteri peptida bioaktif dari bakteri endofit dan eksofit simbion alga merah *E. cottonii* ?
3. Apakah terdapat pengaruh perbedaan kisaran berat molekul peptida bioaktif terhadap aktivitas antibakterinya ?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah maka tujuan penelitian ini adalah:

1. Menentukan aktivitas antibakteri protein bioaktif dari bakteri endofit dan eksofit simbion alga merah *E. cottonii*.
2. Menentukan aktivitas antibakteri peptida bioaktif dari bakteri endofit dan eksofit simbion alga merah *E. cottonii*.
3. Menentukan pengaruh perbedaan kisaran berat molekul peptida bioaktif dari terhadap aktivitas antibakterinya.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat sebagai berikut:

1. Memberikan data ilmiah mengenai protein dan peptida bioaktif yang dihasilkan dari bakteri endofit dan eksofit simbion alga merah *E. cottonii*.
2. Menghasilkan senyawa protein dan peptida yang dapat berpotensi sebagai antibakteri.
3. Pengembangan industri farmakologi di masa depan.

BAB II

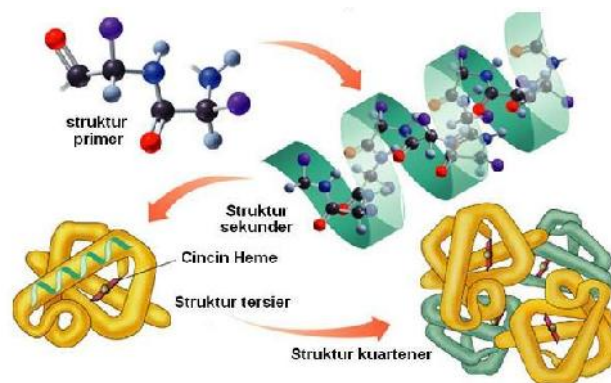
TINJAUAN PUSTAKA

A. Protein dan proses hidrolisisnya

1. Protein

Protein berasal dari bahasa Yunani "*proteios*" yang berarti pertama atau utama. Protein merupakan makromolekul yang menyusun lebih dari separuh bagian dari sel. Protein menentukan ukuran dan struktur sel, komponen utama dari sistem komunikasi antar sel serta sebagai katalis berbagai reaksi biokimia di dalam sel. Karena itulah sebagian besar aktivitas penelitian biokimia tertuju pada protein khususnya hormon, antibodi, dan enzim (Fatchiyah, 2011).

Protein adalah zat makanan yang mengandung nitrogen yang diyakini sebagai faktor penting untuk fungsi tubuh, sehingga tidak mungkin ada kehidupan tanpa protein (Muchtadi, 2010). Protein memegang peranan penting dalam hampir semua proses biologi. Protein merupakan komponen penting atau komponen utama sel hewan atau manusia. Protein dapat dikelompokkan menjadi 4 struktur yaitu struktur primer, sekunder, tersier, dan kuarternar.



Gambar 1. Struktur Protein (Susanto, 2019).

Protein merupakan makromolekul yang terdiri dari rantai asam amino yang dihubungkan oleh ikatan peptida membentuk rantai peptida dengan berbagai panjang dari dua asam amino (dipeptida), 1-10 peptida (oligopeptida), dan lebih dari 20 asam amino (polipeptida) (Fatchiyah, 2011). Tiap jenis protein mempunyai perbedaan jumlah dan distribusi jenis asam amino penyusunnya. Berdasarkan susunan atomnya, protein mengandung 50-55% atom karbon (C), 20-23% atom oksigen (O), 12-19% atom nitrogen (N), 6-7% atom hidrogen (H), dan 0,2-0,3% atom sulfur (S) (Berdanier, *et al.*, 2006).

2. Hidrolisis protein

Hidrolisis adalah penguraian molekul besar menjadi molekul yang lebih kecil dengan menggabungkannya dengan air. Dalam kasus pemecahan protein, ikatan peptida menjadi rusak dengan adanya penyisipan atau masuknya komponen air $-H$ dan $-OH$ (Susanto, 2019). Setiap jenis protein menghasilkan campuran atau proporsi jenis-jenis

asam amino yang khas setelah hidrolisis (Wisuthiphaet dan Kongruang, 2015).

Hidrolisis asam merupakan proses yang keras dan menggunakan suhu yang tinggi. Hidrolisis asam memutuskan ikatan-ikatan peptida pada protein dan menghancurkan beberapa asam amino yang dibebaskan. Triptofan biasanya hancur sepenuhnya. Sistein, serin dan treonin sebagian rusak pada hidrolisis asam. Asparagin dan glutamin diubah menjadi bentuk asamnya. Vitamin hancur selama hidrolisis asam. Garam terbentuk selama netralisasi yang menghasilkan produk dengan kadar garam yang tinggi (Hasnaliza *et.al.*, 2010).

Hidrolisis dengan menggunakan enzim proteolitik lebih aman dibandingkan dengan hidrolisis asam, tidak menggunakan suhu yang tinggi dan biasanya memiliki target ikatan peptida yang spesifik. Hasil dari pemecahan oleh enzim proteolitik berupa campuran asam amino dan polipeptida dengan panjang yang bervariasi. Enzim pepsin akan memotong rantai asam amino dengan ikatan leusin atau fenilalanin. Papain akan memotong ikatan yang berdekatan dengan arginin, lisin, dan fenilalanin. Pancreatin menunjukkan aktivitas untuk arginin, lisin, tyrosin, triptofan, fenilalanin dan leusin (Hasnaliza *et al.*, 2010).

Hasil hidrolisis protein dievaluasi berdasarkan derajat hidrolisis (DH) yaitu persen (%) ikatan peptida yang terhidrolisis terhadap total ikatan peptida dalam bahan (Susanto, 2019). Pemecahan oleh papain maksimum pada pH 7,0 untuk menghasilkan kelarutan yang baik

(Manninen, 2009). Hidrolisis enzimatis menggunakan enzim pepsin optimal pada pH 2 untuk memutus ikatan peptida (Prastika *et al.*, 2019).

Spesifisitas suatu enzim dengan peptida bekerja seperti gembok dan kunci. Posisi enzim akan mengkatalisis ikatan peptida ditentukan oleh spesifisitas enzim proteolitik (Tavano, 2016). Spesifisitas enzim proteolitik berbeda-beda, hal ini sangat penting sebagai pertimbangan dalam pemilihan enzim proteolitik yang sesuai dengan sumber protein yang akan dihidrolisis. Berikut spesifisitas enzim proteolitik disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Enzim proteolitik spesifik

Enzim Protease	Reaksi Hidrolisis
Tripsin	N-terminal Arg dan Lys pada posisi P1
Papain	Asam amino yang mengandung rantai sampai hidrofobik besar pada posisi P2
Pepsin	Rantai samping hidrofobik, residu aromatik lebih disukai
Subtilisin	Hidrolisis protein dengan spesifisitas luas untuk ikatan peptida, dan preferensi untuk residu yang tidak bermuatan besar dalam P1
Termolisin	Menghidrolisis amida peptida C-terminal Leu dan Phe pada posisi P1
Kimotripsin	Menghidrolisis amida peptida N-terminal Tyr, Trp, Phe, Leu, pada posisi P1

B. Peptida Bioaktif

Peptida merupakan fragmen protein yang terdiri dari asam amino, bergabung melalui ikatan kovalen yang dikenal sebagai ikatan peptida (Sanchez dan Vasquez, 2017). Peptida terdiri dari 2 sampai 20 residu asam amino (Wang dan Zhang, 2016). Beberapa peptida secara biologi

aktif mempunyai pengaruh positif terhadap beberapa fungsi dan kondisi tubuh terutama dalam hal kesehatan disebut sebagai peptida bioaktif.

Peptida bebas sudah tersedia secara alamiah, namun kebanyakan peptida bioaktif masih terikat dalam protein asal dan dilepas melalui hidrolisis enzimatis (Sanchez dan Vasquez, 2017). Peptida dikenal sebagai bahan yang selektif dan efektif sekaligus relatif lebih aman bagi tubuh (Fosgerau dan Hoffmann, 2015) karena berasal dari protein sehingga tidak dianggap sebagai benda asing sebagaimana obat kimia. Selain itu, peptida dapat dimetabolisme lebih cepat daripada senyawa organik sehingga dapat mengurangi risiko kontaminasi residu pada produk hewan seperti susu, telur dan daging. Pada hewan yang diberikan pengobatan kimia lebih berisiko meninggalkan residu pada produknya yang disebabkan oleh senyawa obat yang sulit dimetabolisme atau didegradasi oleh tubuh.

Peptida bioaktif telah didiskusikan secara luas dalam komunitas ilmiah sebagai salah satu kelompok nutrasetikal yang menjadi perhatian dalam bidang pangan dan gizi. Banyak literatur yang melaporkan tentang bioaktivitas peptida secara *in vitro* dan berbagai jenis aktivitas telah dilaporkan, meliputi sifat antimikroba, antikarsinogenik, antiinflamasi, antihipertensi, kemampuan menurunkan kolesterol, antitrombotik, aktivitas antioksidan, meningkatkan absorpsi/bioavailabilitas mineral, dan aktivitas opioid (Dulal, 2010).

C. Peptida Sebagai Bahan Antibakteri

Peptida antimikroba (antimicrobial peptides/ AMPs) biasanya tersusun dari 12-50 asam amino dan mempunyai struktur amfipatik (Lai dan Gallo, 2009). Peptida antibakteri biasanya bermuatan positif dan hidrofobik yang memungkinkan untuk berinteraksi dengan muatan negatif pada permukaan membran sel bakteri. Selanjutnya, peptida menyisip dan membentuk pori yang berakibat pada kerusakan membran dan kematian sel bakteri (Bechinger dan Gorr, 2017).

Peptida antimikroba diketahui berperan aktif sebagai antibakteri dan antijamur. Beberapa diantaranya bahkan mempunyai efek sebagai antivirus. Tingginya permasalahan resistensi terhadap antibiotik konvensional telah menumbuhkan minat para peneliti untuk mengembangkan AMPs sebagai obat alternatif bagi penderita dengan resistensi antibiotik. Penggunaan antimikroba dari senyawa peptida dalam bidang pengobatan sangat potensial, karena AMPs dapat merekonstruksi sel target dan memiliki kemampuan antimikroba yang lebih kuat dibanding antibiotik biasa (Nirmagustina dan Wirawati, 2014).

Kusumaningtyas (2015) melaporkan beberapa peptida antimikroba yang berasal dari susu dan fungsinya untuk meningkatkan status kesehatan hewan. Hidrolisis protein susu menghasilkan peptida antimikroba diantaranya adalah casecidin dan isracidin. Peptida casecidin 15 (YQEPV LGPVRGPFPI) dilaporkan dapat menghambat *E. coli* DPC6053 dengan minimum inhibitory concentration (MIC) 0,5 mg/ml,

E. coli DH5 (MIC 0,4 mg/ml) dan *Enterobacter sakazakii* (MIC >1 mg/ml), sedangkan peptida isracidin (RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF) dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* DPC6025 dan *E. coli* DH5 dengan MIC 0,2 mg/ml serta *E. sakazakii* (MIC 0,5 mg/ml) (Birkemo *et al.*, 2009).

Peptida antimikroba baik yang alami maupun hasil sintesis mempunyai spektrum aktivitas yang luas untuk melawan bakteri Gram positif dan negatif, jamur serta virus. Beberapa peptida menunjukkan kemampuan untuk menghambat *S. aureus* resisten terhadap metisilin, dan *Pseudomonas aeruginosa* yang resisten berbagai antibiotik (Wang *et al.*, 2016). Kedua bakteri tersebut menjadi rentan karena aktivitas peptida secara langsung pada membran.

Peptida antimikroba yang telah dikenal mempunyai aktivitas antibakteri adalah cecropin dan magainin. Cecropin sintesis menunjukkan aktivitas penghambatan yang kuat terhadap bakteri *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megatherium*, dan *Microsporium luteus* (Ren *et al.*, 2015). Peptida tersebut awalnya diisolasi dari kulit katak Afrika, *Xenopus laevis*. Peptida sintetik dari magainin 2 menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan negatif seperti *E. coli*, *S. aureus*, dan *Klebsiella pneumonia* (Zasloff, 2002).

Beberapa hasil penelitian peptida bioaktif dari berbagai sumber ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Aktivitas peptida bioaktif dari beberapa sumber

No	Peptida	Bobot Molekul (kDa)	Aktivitas	Referensi
1.	Casocidin-I	4,8	Antibakteri	Lestari dan Giordan, 2020
2.	PgD5	5,7	Antibakteri dan antifungal	Picart, <i>et al.</i> , 2012
3.	BGAP	8,5	Antifungal	Wang, <i>et al.</i> , 2019
4.	WAMP-1a	5,4	Antibakteri	Odinstova <i>et. al.</i> , 2009

D. Alga Merah (*Eucheuma cottonii*)

Alga merah *E. cottonii* merupakan kelompok alga yang jenis-jenisnya memiliki berbagai bentuk dan variasi warna. Salah satu indikasi dari *E. cottonii* adalah terjadi perubahan warna dari warna aslinya menjadi ungu atau merah apabila alga tersebut terkena panas atau sinar matahari secara langsung. *E. cottonii* merupakan golongan alga yang mengandung karaginan dan agar bermanfaat dalam industri kosmetik dan makanan (Iksan, 2005; Anggadiredja, 2007; Soenardjo, 2011).

Keadaan warna selalu tetap, kadang-kadang berwarna hijau, hijau kuning, abu-abu, atau merah sering terjadi hanya karena factor lingkungan (Sunaryo, 2012). Umumnya *E. cottonii* tumbuh dengan baik di daerah pantai terumbu (reef). Habitat khasnya adalah daerah yang memperoleh aliran air laut. Kondisi perairan yang sesuai untuk budidaya rumput laut *E. cottonii* yaitu perairan terlindung dari terpaan angin dan gelombang yang besar, kedalaman perairan 7,65 – 9,72 m, salinitas

33 – 35 ppt, suhu air laut 28 – 30 °C, kecerahan 2,5 – 5,25 m, pH 6,5 – 7, dan kecepatan arus 22 – 48 cm/detik (Iksan, 2005).

E. cottonii mempunyai ciri-ciri yaitu *thallus* silindris, percabangan *thallus* berujung runcing atau tumpul, ditumbuhi *nodulus* (tonjolan - tonjolan), berwarna coklat kemerahan, *cartilagineus* (menyerupai tulang rawan atau muda), percabangan bersifat *alternates* (berseling), tidak teratur serta dapat bersifat *dichotomus* (percabangan dua-dua) atau *trichotomus* (sistem percabangan tiga-tiga). *E. cottonii* memerlukan sinar matahari untuk proses fotosintesis, oleh karena itu, alga jenis ini hanya mungkin dapat hidup pada lapisan fotik, yaitu pada kedalaman sejauh sinar matahari masih mampu mencapainya. Di alam, jenis ini biasanya hidup berkumpul dalam satu komunitas atau koloni (Sunaryo, 2012). Berikut adalah klasifikasi dari *E. cottonii*.

Kingdom : Plantae
Divisi : Rhodophyta
Kelas : Rhodophyceae
Ordo : Gigartinales
Famili : Solieraceae
Genus : *Eucheuma*
Spesies : *Eucheuma cottonii*



Gambar 2. Alga Merah (*Euclima cottonii*).

E. cottonii mengandung karbohidrat, protein, sedikit lemak, dan abu. Selain itu juga merupakan sumber vitamin, seperti vitamin A, B1, B2, B6, B12, dan vitamin C, serta mengandung mineral seperti K, Ca, P, Na, Fe, dan Iodium (Suparmi dan Sahri, 2009). Komposisi kimia *E. cottonii* dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi kimia *E. cottonii*

Komposisi	Jumlah
Air	12,90 %
Protein	5,12 %
Lemak	0,13 %
Karbohidrat	13,38 %
Serat kasar	1,39 %
Abu	14,21 %
Ca	52,82 ppm
Fe	0,11 ppm
Riboflavin	2,26 mg/100 g
Vitamin C	4,00 mg/100 g
Karagenan	65,75 %

(Suparmi dan Sahri, 2009)

E. Bakteri Simbion

Bakteri laut memiliki potensi untuk hidup bersimbion dengan tanaman laut seperti alga. Menurut Hollants, *et al.*, (2012), permukaan alga kaya akan bakteri simbion. Bakteri memiliki kemampuan untuk mendegradasi senyawa organik menjadi senyawa anorganik yang menjadi sumber makanan bagi fitoplankton yang merupakan piramida dasar dari rantai makanan di laut (Zheng, *et al.*, 2005).

Bakteri simbion pada alga ada yang hidup diluar permukaan disebut bakteri simbion eksofit dan ada yang hidup didalam jaringan disebut bakteri simbion endofit. Komunitas bakteri eksofit yang telah dilaporkan penting untuk morfologi pengembangan alga dan bakteri ini dianggap melindungi alga dari patogen dan organisme lainnya (Janakidevi, 2013). Beberapa spesies bakteri menunjukkan aktivitas spesifik inang bakterisidal melawan patogen spesifik yang melibatkan interaksi biokimia yang kompleks antara rumput laut dan bakteri (Strobel, 2003).

Bakteri endofit menghabiskan seluruh atau sebagian siklus hidupnya didalam jaringan dan tidak menyebabkan gejala tertentu pada inangnya. Komunitas bakteri endofit memberikan keuntungan terhadap tanaman inangnyaseperti melindungi inangnya dari patogen dan mampu menstimulasi pertumbuhan tanaman. Interaksi bakteri simbion dengan inangnya memiliki hubungan simbiosis mutualisme sehingga memungkinkan bakteri menghasilkan senyawa bioaktif yang sama seperti yang terkandung pada inangnya (Rori, *et. al.*, 2020).

F. Isolasi Bakteri

Mikroorganisme/bakteri pada suatu lingkungan alami merupakan populasi campuran dari berbagai jenis mikroorganisme pada tanah, air, udara, makanan, maupun yang terdapat pada tubuh hewan dan tumbuhan. Pemisahan mikroorganisme diperlukan untuk mengetahui jenis, mempelajari kultural, morfologi, fisiologi, dan karakteristik mikroorganisme tersebut. Teknik pemisahan tersebut disebut isolasi yang disertai dengan pemurnian (Irianto, 2006). Isolasi merupakan serangkaian proses pemisahan mikroorganisme supaya didapatkan kultur murni (isolat).

Isolasi bakteri simbion dapat dilakukan baik pada tumbuhan maupun hewan. Bakteri simbion pada tumbuhan diisolasi dari bagian akar, batang, dan daun. Bagian-bagian tanaman tersebut dipisahkan dan dicuci bersih menggunakan aquades steril untuk menghindari kontaminasi mikroorganisme yang tidak diharapkan yaitu bakteri eksofit dari bagian-bagian tanaman. Permukaan tanaman juga direndam menggunakan HgCl_2 untuk mensterilkan bagian tanaman tersebut dan dipotong dengan ukurang yang kecil. Hasil potongan dari bagian tanaman diberikan larutan NaCl dan dilakukan secara aseptik (Susilowati, 2018).

Isolasi bakteri simbion dari hewan juga dapat dilakukan dengan mengisolasi bakteri dari jaringan hewan tertentu, misalnya pada hewan avertebrata seperti moluska. Bagian moluska yang diambil adalah

jaringan lunaknya dengan memisahkan bagian cangkangnya. Jaringan moluska lunaknya kemudian dicuci bersih dan di potong-potong kecil dan disterilkan menggunakan larutan pensteril agar mikroorganisme luar ikut tercampur (Bahry dan Pringgenies, 2016).

Isolat-isolat tersebut kemudian ditumbuhkan pada medium terpisah supaya dapat tumbuh dengan baik. Medium pertumbuhan bakteri harus diperbarui setiap 6 bulan supaya sumber nutrisi bagi bakteri tetap terpenuhi sehingga bakteri tidak mengalami kematian. Pemindahan bakteri dari satu tempat ketempat yang lain harus menggunakan prosedur kerja *aseptik*. *Aseptik* berarti berada dalam kondisi yang bebas dari mikroorganisme lain yang tidak dikehendaki. Teknik *aseptik* sangat penting jika bekerja di Laboratorium Mikrobiologi, selain melindungi laboran juga menghindari kontaminasi mikroorganisme lain (Radji,2010). Teknik kultur untuk mendapatkan biakan murni terbagi menjadi tiga macam teknik, yaitu (Pelczar & Chan, 2007):

1. Cara Penuangan (Pour Plate)

Cara penuangan merupakan metode inokulasi mikroba yang dilakukan dengan cara menuangkan suspensi mikroba sebanyak 1 ml kedalam cawan petri steril kosong. Cawan petri tersebut selanjutnya dituangi medium agar dengan suhu 40°C-45°C dan diratakan dengan cara cawan petri digerak-gerakan membentuk angka 8. Medium selanjutnya

diinkubasi selama 1-2 hari dan diamati ada tidaknya pertumbuhan mikroba.

2. Cara Penyebaran (Spread Plate)

Cara penyebaran merupakan metode inokulasi mikroba yang dilakukan dengan cara menuangkan suspensi mikroba sebanyak 0,1 ml diatas medium agar cawan yang telah memadat. Suspensi tersebut kemudian diratakan dengan menggunakan batang L secara pelan-pelan supaya tidak merusak permukaan medium agar cawan. Medium cawan selanjutnya diinkubasi selam 1-2 hari dan diamati ada tidaknya pertumbuhan mikroba.

3. Cara Penggoresan (Streak Culture)

Cara penggoresan merupakan cara yang ditujukan untuk memurnikan mikroba dari populasi mikroba atau dapat juga untuk subkultur isolat murni dari medium lama ke medium baru. Teknik tersebut hanya bisa dilakukan dari medium cair ke medium agar atau dari medium agar ke medium agar lainnya dan dilakukan dengan cara menggoreskan ujung jarum ose yang telah mengandung mikroba ke permukaan medium agar lain.

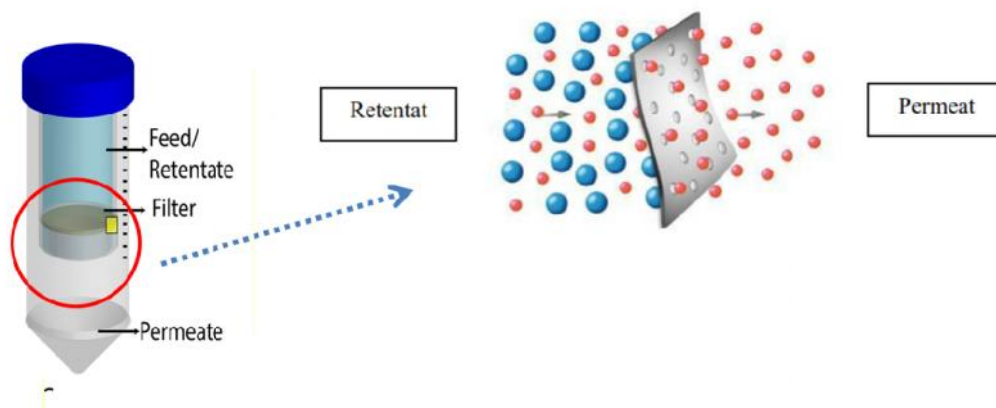
Menurut Wulandari dan Rahayu (2015), proses menggores mikroba pada medium, dapat dilakukan dengan mengikuti pola tertentu seperti bentuk kuadran, segitiga, huruf T, atau berkreasi sendiri sesuai dengan keinginan. Hal yang diperhatikan dalam cara penggoresan adalah setiap

goresan yang satu harus bersambung dengan goresan berikutnya sehingga pada goresan terakhir diharapkan mikroba tumbuh membentuk satu koloni yang berasal dari satu sel dan terpisah dari koloni lainnya

G. Ultrafiltrasi

Ultrafiltrasi adalah proses penyaringan dengan ukuran ultra yang mampu menyaring peptida hingga diperoleh bobot molekul tertentu, yang dapat berfungsi sebagai peptida bioaktif. Penggunaan sistem ultrafiltrasi sering disebut dengan *molecul weight cut off*, sangat berpotensi dalam menghasilkan peptida aktif (BM < 10 kDa). Prinsip kerja sistem tersebut adalah melewatkan substansi zat terurai pada penyaring *millipore* dengan bantuan tingkat pemutaran tertentu sehingga diperoleh protein dengan berat molekul yang sangat rendah (Susanto, 2019).

Perpindahan molekul-molekul protein dari salah satu sisi membran ke sisi lainnya bergantung interaksinya dengan pori membran. Molekul protein yang memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan ukuran pori membran maka molekul yang lebih besar akan tertahan disisi retentat. Molekul protein dengan ukuran lebih kecil dibandingkan dengan ukuran pori akan melewati pori dan menuju sisi lain dari membran.



Gambar 3. Ilustrasi mekanisme pemisahan dengan membran MWCO (Susanto, 2019).

H. Uji Antibakteri

Mikroorganisme dapat menyebabkan infeksi, menimbulkan penyakit dan merusak bahan pangan. Senyawa antimikroba adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme dan dapat digunakan untuk penelitian pengobatan infeksi pada manusia maupun hewan. Antimikroba meliputi antifungi, antibakteri, antiprotozoa, dan antivirus (Omar *et.al.*, 2012).

Antibakteri diartikan sebagai bahan yang dapat mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri sehingga dapat memiliki sifat menghambat perkembangbiakan bakteri (bakteriostatik) atau sifat mematikan bakteri (bakterisidal) dalam menghentikan aktivitas sel bakteri. Aktivitas antimikroba dapat ditentukan dengan dua cara yaitu metode difusi dan dilusi. Pada metode difusi termasuk di dalamnya metode *disk diffusion* (tes Kirby & Bauer), *ditch-plate technique*, *cup-plate technique*.

Sedangkan pada metode dilusi termasuk di dalamnya metode dilusi cair dan dilusi padat (Juliantina, 2008).

1. Metode Kirby and Bauer (Kertas cakram)

Metode difusi cakram merupakan cara yang paling sering digunakan untuk menentukan kepekaan antibakteri terhadap suatu antibiotik. Pada cara ini digunakan suatu cakram kertas saring (*paper disc*) yang berfungsi sebagai tempat menampung zat antibakteri. Kertas saring tersebut kemudian diletakkan pada lempeng agar yang telah diinokulasi mikroba uji, kemudian diinkubasi pada waktu tertentu dan suhu tertentu, sesuai dengan kondisi optimum dari mikroba uji. Pada umumnya, hasil yang didapat bisa diamati setelah inkubasi selama 18- 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri (Basir *et al.*, 2017).

2. Cara Parit (Ditch-plate technique)

Pada metode ini lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji dibuat sebidang parit. Parit tersebut berisi zat antibakteri, kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu optimum yang sesuai untuk mikroba uji. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada tidaknya zona hambat yang akan terbentuk di sekitar parit (Basir *et al.*, 2017).

3. Cara Sumuran (Hole/Cup-plate technique)

Metode ini lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji dibuat suatu lubang yang selanjutnya diisi dengan zat antibakteri uji. Setelah diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai dengan bakteri uji, dilakukan pengamatan dengan melihat ada atau tidaknya zona hambatan di sekeliling lubang (Basir *et al.*, 2017).

4. Metode E-test (epsilometer)

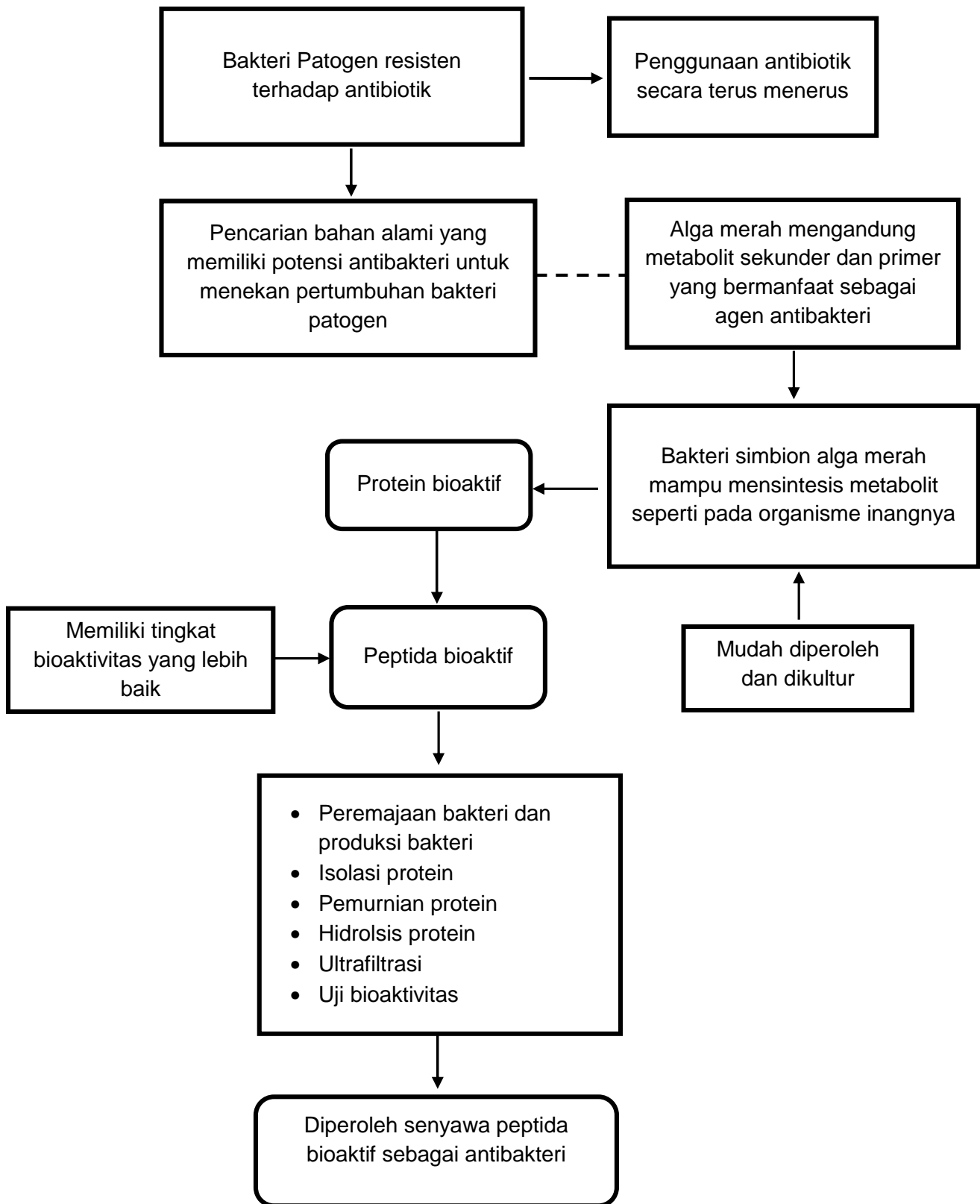
Metode gabungan antara metode dilusi dan metode difusi antibakteri kedalam media. Metode ini dilakukan dengan menggunakan strip plastik yang sudah mengandung agen antibakteri dengan konsentrasi terendah sampai tertinggi yang diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme. Hambatan pertumbuhan mikroorganisme bisa diamati dengan adanya area jernih di sekitar strip tersebut (Basir *et al.*, 2017).

I. Kerangka Pikir

Penggunaan antibiotik secara terus menerus dalam menanggulangi masalah infeksi oleh bakteri patogen memicu timbulnya bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik, seperti *S. aureus* dan *E. coli*. Resistensi merupakan kemampuan bakteri dalam menetralkan dan melemahkan daya kerja antibiotik. Salah satu bahan alam yang potensial untuk dijadikan bahan baku obat adalah biota laut seperti alga. Beberapa alga telah dilaporkan menunjukkan aktivitas antibakteri, salah satu diantaranya

adalah kelompok alga merah. Alga dapat hidup berasosiasi dengan bakteri. Hubungan asosiasi antara alga dan bakteri dapat berpengaruh secara fisiologis dan metabolis. Interaksi spesifik antara bakteri simbion dengan inangnya yaitu alga mampu memberi peluang adanya kesamaan metabolit yang dihasilkan.

Peptida bioaktif merupakan salah satu agen antibakteri yang dapat dikembangkan karena memiliki selektivitas dan spesifisitas yang tinggi terhadap bakteri. Produksi peptida bioaktif dapat diperoleh melalui beberapa tahapan yaitu isolasi protein, pemurnian protein, hidrolisis protein dan ultrafiltrasi. Aktivitas antibakteri dari peptida bioaktif selanjutnya diuji pada bakteri *S. aureus* (gram positif) dan *E. coli* (gram negatif). Adapun kerangka pikir penelitian secara skematik ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Kerangka Pikir Penelitian

J. Hipotesis

Hipotesis yang dapat dirumuskan berdasarkan kerangka pikir yang telah diuraikan yaitu:

1. Protein bioaktif yang diperoleh dari bakteri endofit dan eksofit simbion alga merah *E. cottonii* memiliki potensi sebagai antibakteri.
2. Peptida bioaktif yang diperoleh dari bakteri endofit dan eksofit simbion alga merah *E. cottonii* memiliki potensi sebagai antibakteri.
3. Terdapat pengaruh perbedaan kisaran berat molekul peptida bioaktif terhadap aktivitas antibakterinya.