

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai negara kepulauan terbesar di dunia memiliki potensi sumber daya laut yang sangat melimpah dengan luas perairan mencapai 5.8 juta kilometer persegi dan garis pantai sepanjang 81.000 kilometer, Indonesia memiliki kekayaan alam yang luar biasa di sektor kelautan. Indonesia dikenal sebagai negara kepulauan terbesar di dunia, dengan sumber daya alam yang sangat melimpah. Perairan laut dan pantai berperan sebagai tempat penyimpanan aset keanekaragaman hayati laut, pengendali lingkungan hidup dunia, pemasok wilayah bagi berbagai populasi organik, sumber mata pencaharian bagi individu, dan sumber makanan dari berbagai jenis biota laut (Sultan dan Ramadhan, 2024). Ekosistem laut Indonesia memiliki peran krusial dalam konservasi keanekaragaman hayati global dengan wilayah yang kaya akan terumbu karang, mangrove, dan padang lamun. Keanekaragaman hayati laut yang sangat tinggi menjadikan Negara Indonesia sebagai rumah bagi berbagai spesies endemik (Salayan et al., 2024). Keanekaragaman hayati lingkungan laut merupakan salah satu ekosistem terkaya dan paling kompleks dengan kelimpahan biota laut. Potensi sumber daya hayati yang ada di laut dapat menjadi peluang untuk menciptakan suatu produk yang berasal dari bahan alam (Zamani et al., 2021).

Lingkungan laut berpotensi menghasilkan banyak senyawa alami dengan struktur unik dan aktivitas biologis produk alam laut yang memainkan peran penting dalam bidang pengembangan obat baru. *Marine natural product* (MNP) telah menarik perhatian dunia melalui senyawa bioaktifnya yang luar biasa. Senyawa bioaktif yang dihasilkan menunjukkan aktivitas biologis potensial seperti antibakteri, antikanker, antitumor, antivirus, dan imunostimulan (Dai et al., 2020; Sibero et al., 2022). Organisme laut menjadi fokus perhatian karena kapasitas organisme dalam menghasilkan senyawa aktif yang bermanfaat dalam berbagai bidang. Keanekaragaman hayati yang ada laut merupakan sumber daya alam yang kaya akan senyawa aktif biologis. Organisme laut hidup di habitat yang kompleks dan terpapar pada kondisi ekstrim sehingga berpotensi menghasilkan berbagai macam zat aktif spesifik. Senyawa aktif biologis yang berasal dari biota laut dapat bekerja secara efisien pada target molekuler. Beberapa biota laut seperti ikan, alga, dan sebagian besar invertebrata laut seperti spons, moluska, tunikata, *coelenterata*, dan krustasea berpotensi menghasilkan senyawa bioaktif yang berperan penting dalam bidang kesehatan khususnya dalam pengobatan (Karthikeyan et al., 2022; Rigogliuso et al., 2023).

Beberapa organisme laut dapat menyimpan senyawa bioaktif melalui metabolit sekunder yang dihasilkan. Potensi senyawa bioaktif yang sangat tinggi dibutuhkan dalam berbagai bidang kehidupan terutama di bidang kesehatan. Saat ini, jumlah penelitian tentang senyawa bioaktif yang diisolasi dari organisme laut meningkat

secara signifikan setelah inventarisasi seratus senyawa baru setiap tahun. Senyawa bioaktif tersebut diisolasi dari berbagai invertebrata laut. Lebih dari 10.000 senyawa bioaktif telah ditemukan pada invertebrata laut, termasuk Tunikata. Salah satu sumberdaya hayati laut yang memiliki potensi senyawa bioaktif yaitu Tunikata. Tunikata tersebar luas di seluruh dunia dan dikenal sebagai sumber daya hayati laut yang melimpah dengan potensi senyawa bioaktif yang kompleks (Zamani *et al.*, 2021; Litaay *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2023). Secara umum, senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh Tunikata diyakini sebagai bagian dari pertahanan ekologi alam. Senyawa bioaktif tersebut telah banyak digunakan dan bermanfaat dalam berbagai bidang industri dan kesehatan. Metabolit sekunder menunjukkan aktivitas biologis potensial salah satunya sebagai antibakteri yang berasal dari Tunikata (Litaay *et al.*, 2023; Sibero *et al.*, 2022).

Saat ini, sekitar 3000 spesies Tunikata dikenal di seluruh dunia, menghuni berbagai habitat laut dari perairan dangkal hingga laut dalam. Tunikata merupakan subfilum Urochordata yang terdiri dari 2 istilah yaitu "uro" artinya ekor dan "chorda" artinya tubuh bagian dalam yang menyokong batang tubuh. Subfilum ini memiliki tiga kelas, yaitu Ascidiacea, Thaliacea, dan Appendicularia. Tunikata juga dikenal dengan istilah lain yaitu *ascidia*, termasuk dalam Filum Chordata dengan ciri bentuk tubuh unik yang disebut *tunic*. Tunikata sebagian besar hidup menempel pada substrat keras di dasar laut (Ismet *et al.*, 2022; Litaay *et al.*, 2019; Litaay *et al.*, 2023). Organisme ini bersifat hermafrodit, penyaring makanan (*filter feeder*), dan memiliki warna tubuh yang berbeda-beda, seperti biru, hijau, kuning, merah, dan cokelat. Tunikata memiliki distribusi yang luas dan dapat ditemukan di berbagai lingkungan laut substrat berbatu di zona pasang surut dan subpasang surut. Beberapa spesies Tunikata merupakan organisme invasif dan keberadaannya menimbulkan ancaman terhadap organisme asli (Ramesh *et al.*, 2021; Ruli dan Tapilatu., 2020).

Tunikata merupakan hewan laut yang sebagian besar hidup menempel pada substrat keras di dasar laut, beberapa spesies Tunikata memiliki sebaran yang luas secara global. Organisme ini merupakan hewan invertebrata yang berfungsi sebagai penyaring air secara alami, tahan terhadap berbagai polutan, mampu menyaring logam berat di perairan yang dapat merusak ekosistem. Selain memiliki sifat invasif dan kemampuan pertumbuhan yang cepat, Tunikata juga dikenal sebagai hewan laut yang menghasilkan senyawa bioaktif. Tunikata atau *ascidia* merupakan organisme laut yang paling banyak dikembangkan untuk produk alami laut untuk aplikasi biomedis, yaitu antibakteri, antitumor, dan antikanker. Secara umum, senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh berbagai Tunikata merupakan bentuk pertahanan diri terhadap lingkungan ekstrim maupun serangan predator (Litaay *et al.*, 2023; Ismet *et al.*, 2022; Lestari *et al.*, 2022). Tunikata memperoleh makanannya melalui penyaringan bahan organik dari air di sekitarnya sehingga melalui mekanisme ini memungkinkan Tunikata menampung mikroorganisme sebagai simbiosis. Mikroorganisme yang bersimbiosis dengan inang invertebrata

khususnya Tunikata telah diidentifikasi sebagai salah satu biota laut penghasil sumber metabolit sekunder (Litaay et al., 2019; Ramesh et al., 2021).

Tunikata merupakan biota laut yang memiliki potensi besar dan jumlah yang cukup melimpah di perairan Indonesia, namun pemanfaatannya kurang optimal karena belum mendapatkan perhatian serius. Meskipun Indonesia memiliki berbagai macam spesies Tunikata yang melimpah, namun hanya 12% di antaranya yang diisolasi sebagai penghasil metabolit sekunder salah satunya dari famili Stylidae (Ngantung dkk., 2019; Sibero et al., 2022). Salah satu spesies *ascidia* yang memiliki kelimpahan tinggi dan dapat menghasilkan senyawa bioaktif yaitu spesies *Polycarpa aurata*. *Polycarpa aurata* merupakan salah satu Tunikata laut dari famili Stylidae yang tersebar di wilayah tengah dan timur Indonesia. Spesies ini berpotensi menghasilkan metabolit sekunder yang dapat digunakan sebagai kandidat antibakteri. Tunikata yang mengandung berbagai bakteri simbiotik memiliki potensi aktivitas biologis dengan menghasilkan berbagai macam metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, dan steroid. Selain itu, terdapat beberapa senyawa seperti 4-metokspirol, metanol, etanol, butanol, dan heksana yang dihasilkan dari Tunikata. Beberapa kandungan senyawa bioaktif *Polycarpa aurata* seperti dehidrotirosil atau dopa- dan top dehidrodopyl peptida ditemukan dalam tubuh Tunikata. Penemuan senyawa bioaktif yang diisolasi dari bakteri endosimbion pada Tunikata terdiri dari berbagai senyawa alkaloid, polipeptida, dan poliketida berpotensi dikembangkan menjadi kandidat antibakteri (Lestari et al., 2022; Sibero et al., 2022; Raisa et al., 2021).

Senyawa bioaktif yang ditemukan pada biota laut diharapkan dapat berperan di bidang farmasi, kesehatan, maupun industri. Salah satu biota laut yang berpotensi sebagai penghasil senyawa bioaktif yaitu Tunikata melalui simbiosis mikroorganisme. Bakteri endosimbion dari beberapa jenis Tunikata dapat menghasilkan senyawa bioaktif dengan berbagai fungsi. Senyawa bioaktif tersebut telah banyak digunakan dan bermanfaat dalam berbagai bidang misalnya, salah satu penelitian telah membuktikan bahwa Tunikata memiliki senyawa bioaktif yang dapat digunakan sebagai penghambat kanker payudara. Pengembangan senyawa bioaktif *Polycarpa aurata* sebagai antibakteri telah dilakukan oleh dan diujicobakan pada bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (Ningsih dan Sawiya., 2023; Ismet et al., 2022; Lestari et al., 2022; Litaay et al., 2023). Kandungan metabolit sekunder dari bakteri endosimbion tersebut merupakan salah satu bahan substansi bioaktif yang telah dieksplorasi berpotensi sebagai salah satu bahan senyawa bioaktif penghasil antibakteri untuk pembuatan antibiotik. Antibakteri mempunyai efek menekan atau menghentikan aktivitas mikroorganisme lain, khususnya dalam menghambat bakteri patogen (Sardiani et al., 2015).

Eksplorasi senyawa-senyawa baru dari alam akan terus dilakukan untuk memperoleh bahan obat baru dalam mengatasi *multidrug* resisten terhadap penggunaan obat-obatan seperti antibiotik. Penggunaan bahan alam sebagai antibiotik diharapkan dapat mengurangi resistensi dan tidak menimbulkan efek samping (Habibi dkk., 2022). Pencarian bahan senyawa-senyawa bioaktif penghasil

antibiotik baru, berupa antibakteri yang mampu menghambat hingga membunuh bakteri patogen sangat perlu untuk dikaji lebih lanjut (Sardiani et al., 2015). Berdasarkan uraian tersebut, maka telah dilakukan penelitian untuk mengetahui potensi dan senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri endosimbion Tunikata *Polycarpa aurata* sebagai kandidat antibakteri sebagai upaya dalam penemuan antibiotik baru.

1.2 Tujuan penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Menganalisis potensi senyawa bioaktif bakteri endosimbion dari Tunikata *Polycarpa aurata* sebagai kandidat antibakteri
2. Mengetahui karakteristik dari bakteri endosimbion Tunikata *Polycarpa aurata*.
3. Mengidentifikasi profil senyawa bioaktif *Polycarpa aurata* menggunakan analisis GC-MS dan FTIR.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah sebagai bahan informasi mengenai potensi senyawa bioaktif yang diperoleh dari bakteri endosimbion Tunikata *Polycarpa aurata* sebagai kandidat antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Oleh karena itu, diharapkan penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan dan sumber informasi baru terkait penemuan antibakteri melalui pemanfaatan senyawa bioaktif dari bahan alam.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan Juli sampai dengan Desember 2024. Pengambilan sampel dilakukan di Pulau Barranglompo, Kota Makassar, Sulawesi Selatan. Preparasi sampel dilakukan di Laboratorium Ilmu Lingkungan dan Kelautan. Ekstraksi sampel dilakukan di Laboratorium Kimia Organik. Pengujian sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi. Analisis FTIR dilakukan di Laboratorium Kimia Terpadu Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Analisis GC-MS dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang (PNUP).

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri, *object glass*, gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, erlenmeyer, batang pengaduk, ose bulat, ose lurus, pencadang, sendok tanduk, bunsen, rak tabung reaksi, inkubator, *hot plate*, sentrifus, *shaker*, autoklaf, mikroskop, lemari pendingin, dan timbangan analitik, alat dasar selam, *coolbox*, alat GC-MS, dan alat FTIR.

2.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Tunikata *Polycarpa aurata*, *aquadest*, air laut steril, alkohol 70%, etil asetat, media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), media *Tryptic Soy Agar* (TSA), media *Tryptic Soy Broth* (TSB), media *Mueller Hinton Agar* (MHA), media *Sulfide Indole Motility* (SIM), media *Methyl Red-Voges Proskauer* (MR-VP), media *Simmon Citrat Agar* (SCA), media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), minyak emersi, aluminium foil, mikroba uji (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*), kapas, spoit, dan *cling wrap*.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Pengambilan Sampel dan Preparasi Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di perairan Pulau Barranglompo, Makassar, Sulawesi Selatan pada kedalaman 2-10 m dengan bantuan *scuba diving*. Sampel Tunikata *Polycarpa aurata* diambil sebanyak 500 gram dan disimpan di dalam *coolbox* kemudian dibawa ke laboratorium untuk dibersihkan dari organisme pengotor. Sampel tersebut kemudian dibilas dengan air mengalir sebelum dibersihkan menggunakan akuades. Setelah itu, sampel dibawa ke laboratorium mikrobiologi untuk dilakukan pengujian aktivitas antibakteri. Sampel yang telah dibilas kemudian dibelah menjadi 2 bagian menggunakan *scalpel* dan diambil isi bagian dalam (intestinum) lalu dilarutkan menggunakan air laut.

2.3.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Terlebih dahulu disterilkan semua alat dan media yang akan digunakan pada penelitian. Alat yang terbuat dari bahan kaca disterilkan dengan teknik sterilisasi panas kering (udara panas) menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Adapun untuk alat yang terbuat dari logam disterilkan dengan cara dicuci menggunakan alkohol maupun dengan cara dilidiahapikan di atas api bunsen. Adapun sterilisasi media dan akuades dilakukan dengan teknik sterilisasi basah yaitu menggunakan autoklaf. Sterilisasi ini dilakukan selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

2.3.3 Pembuatan Media

Media Nutrient Agar (NA). Terlebih dahulu media NA ditimbang sebanyak 2,3 gram lalu dilarutkan ke dalam 100 mL akuades di dalam erlenmeyer lalu ditutup aluminium foil. Selanjutnya dipanaskan di atas *hot plate* dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah itu, media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Media Tryptic Soy Agar (TSA). Terlebih dahulu media TSA ditimbang sebanyak 4 gram lalu dilarutkan ke dalam 100 mL akuades di dalam erlenmeyer lalu ditutup aluminium foil. Selanjutnya, dipanaskan di atas *hot plate* dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah itu, media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Media Tryptic Soy Broth (TSB). Terlebih dahulu media TSB ditimbang sebanyak 3 gram lalu dilarutkan ke dalam 100 mL akuades kemudian diaduk menggunakan batang pengaduk hingga homogen. Setelah itu, media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Media Mueller Hinton Agar (MHA). Terlebih dahulu media MHA ditimbang sebanyak 3,4 gram lalu dilarutkan ke dalam 100 mL akuades di dalam erlenmeyer lalu ditutup aluminium foil. Selanjutnya, dipanaskan di atas *hot plate* dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah itu, media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Media Nutrient Broth (NB). Terlebih dahulu media NB ditimbang sebanyak 0,8 gram lalu dilarutkan ke dalam 100 mL akuades kemudian diaduk menggunakan batang pengaduk hingga homogen. Setelah itu, media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Media Sulfide Indole Motility (SIM). Terlebih dahulu media SIM ditimbang sebanyak 3 gram lalu dilarutkan ke dalam 100 mL akuades kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga homogen. Selanjutnya, media dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi ditutupi dengan menggunakan aluminium foil lalu disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Media Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP). Terlebih dahulu media MR-VP ditimbang sebanyak 1,7 gram lalu dilarutkan ke dalam 100 mL akuades kemudian diaduk hingga homogen. Selanjutnya, media dimasukkan ke dalam beberapa

tabung reaksi ditutupi dengan menggunakan aluminium foil lalu disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Media *Simmon Citrat Agar (SCA)*. Terlebih dahulu media SIM ditimbang sebanyak 2,24 gram lalu dilarutkan ke dalam 100 mL akuades kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga homogen. Selanjutnya, media dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi ditutupi dengan menggunakan aluminium foil lalu disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Media *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)*. Terlebih dahulu media TSIA ditimbang sebanyak 2,24 gram lalu dilarutkan ke dalam 100 mL akuades kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga homogen. Selanjutnya, media dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi ditutupi dengan menggunakan aluminium foil lalu disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.4 Isolasi Bakteri Endosimbion dari Tunikata *Polycarpa aurata*

Tunikata yang telah dibersihkan kemudian dibelah menjadi 2 bagian lalu diambil isi bagian dalamnya dan digerus menggunakan 2 mL air laut. Setelah itu, dilakukan pengenceran bertingkat hingga pengenceran 10^{-6} . Kemudian pada hasil pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} dimasukkan ke dalam cawan petri lalu dituang media TSA dan dibiarkan memadat. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

2.3.5 Seleksi Bakteri Penghasil Senyawa Bioaktif Antibakteri

Seleksi bakteri dilakukan melalui pengujian antagonis. Pada uji antagonis isolat bakteri ditumbuhkan bersama dengan bakteri uji untuk melihat kemampuan isolat bakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Sebanyak 1 mL bakteri suspensi bakteri uji dimasukkan ke dalam cawan petri lalu ditambahkan 20 mL media TSA dan dibiarkan hingga memadat. Selanjutnya isolat bakteri diinokulasikan pada permukaan media yang telah memadat dengan teknik gores sinambung, kemudian media diinkubasi selama 2 x 24 jam. Isolat bakteri yang mampu menghasilkan senyawa bioaktif antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona hambat atau area bening pada sekitar pertumbuhan koloni bakteri.

2.3.6 Pengujian Aktivitas Antibakteri dari Bakteri Endosimbion

1. Tahap Pra kultur Isolat Bakteri

Terlebih dahulu dilakukan peremajaan stok isolat bakteri (pra kultur) menggunakan media TSB. Isolat bakteri (dinyatakan positif antibakteri) diambil menggunakan ose bulat lalu diinokulasikan pada tabung reaksi berisi media TSB dan dihomogenkan. Setelah semua isolat diinokulasikan pada tabung reaksi, selanjutnya diinkubasi selama 1 x 24 jam. Setelah diinkubasi, masing masing isolat pada media pra kultur (tabung reaksi) diinokulasikan pada media kultur (media TSB) dengan mengambil suspensi isolat dari tabung reaksi menggunakan *spoit* dan dihomogenkan. Selanjutnya media kultur tersebut di *shaker* dengan kecepatan 120

rpm selama 7 x 24 jam.

2. Peremajaan Bakteri Uji

Terlebih dahulu membuat media agar miring untuk peremajaan dan pembuatan stok bakteri uji. Pada penelitian ini bakteri uji yang digunakan yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Stok bakteri uji yang tersedia kemudian diinokulasikan menggunakan ose bulat dengan teknik gores pada media *Nutrient Agar* (NA) miring lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam dan selanjutnya disimpan sebagai stok di dalam kulkas untuk pengujian berikutnya.

3. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi sumuran, prinsip kerja metode difusi adalah terdifusinya senyawa antibakteri ke dalam media padat (Amalia, 2024). Metode sumuran dilakukan dengan terlebih dahulu dituang media base (tanpa bakteri) pada cawan, lalu ditunggu hingga memadat. Selanjutnya dipasang sumuran pada permukaan media *base*. Lalu dituang media berisi bakteri uji pada cawan yang telah dipasangkan sumuran, ditunggu hingga memadat. Setelah memadat, dicabut sumuran pada media uji tersebut, diambil sebanyak 2 mL suspensi isolat lalu dimasukkan ditabung sentrifus dan disentrifugasi selama 15 menit. Selanjutnya, diambil suspensi isolat yang sudah di sentrifus dan dimasukkan ke dalam lubang sumuran. Media uji diinkubasi selama 1 x 24 jam. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya zona hambat di sekeliling lubang sumuran (Dewi et al., 2023).

2.3.7 Karakterisasi Bakteri Endosimbion Tunikata

1. Pengamatan Morfologi Koloni (Makroskopis)

Pengamatan morfologi koloni dilakukan dengan melihat warna, tepi, dan elevasi. Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasikan pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) dengan metode gores kuadran, selanjutnya diinkubasi selama 1 x 24 jam. Koloni yang terbentuk kemudian diamati menggunakan mikroskop stereo dengan perbesaran 40x.

2. Pengamatan Morfologi Sel (Mikroskopis)

Pengamatan morfologi sel dilakukan dengan menggunakan teknik pengecatan gram. Pengecatan gram menggunakan empat cat yaitu cat A (kristal violet), cat B (lugol), cat C (alkohol), dan cat D (safranin). Pertama-tama dibuat ulasan bakteri pada kaca preparat kemudian difiksasi diatas api bunsen. Sebanyak 2-3 tetes cat A (kristal violet) ditetaskan pada ulasan bakteri, diamkan selama 60 detik lalu dibilas menggunakan akuades. Selanjutnya, sebanyak 2-3 tetes cat B (larutan lugol) ditetaskan diatas preparat dan didiamkan selama 60 detik, lalu preparat dibilas menggunakan akuades. Setelah itu, sebanyak 2-3 tetes cat C (alkohol/aseton) ditetaskan pada kaca preparat lalu didiamkan selama 30 detik, kemudian preparat dibilas menggunakan akuades. Kemudian, preparat ditetesi cat D (safranin) sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 30 detik, lalu preparat dibilas

menggunakan akuades. Terakhir, dilakukan pengamatan dibawah mikroskop binokuler perbesaran 100x.

3. Uji Biokimia

a. Uji Produksi Senyawa Indol, Motilitas, dan Produksi H₂S

Diambil isolat bakteri menggunakan ose lurus lalu diinokulasikan dengan cara ditusuk pada media SIM (*Sulfide Indole Motility*) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Hasil positif (motil) apabila terdapat rambatan-rambatan di sekitar area tusukan pada media dan hasil negatif (non motil) bila tidak terdapat rambatan-rambatan di sekitar area tusukan pada media. Selain terbentuknya rambatan, bisa juga ditandai dengan warna media yang semakin keruh di sekitar area tusukan. Selanjutnya, diinkubasi 2 x 24 jam lalu dilakukan uji senyawa indol dengan menambahkan 2-3 reagen *kovacs* untuk melihat produksi senyawa indol dan produksi H₂S. Hasil positif indol ditandai dengan terbentuknya cincin merah lembayung dan hasil positif H₂S terbentuknya endapan hitam pada permukaan media.

b. MR-VP (*Methyl Red-Voges Proskauer*)

1) MR (*Methyl Red*)

Diambil isolat bakteri menggunakan ose bulat dan diinokulasikan pada media MR-VP dalam tabung reaksi. Selanjutnya media diinkubasi selama 5 x 24 jam pada suhu 37°C lalu ditambahkan 2-3 tetes *methyl red*. Hasil positif apabila terbentuk kompleks berwarna merah muda sampai merah yang menandakan bahwa mikroba tersebut menghasilkan asam campuran dari fermentasi glukosa.

2) VP (*Voges Proskauer*)

Diambil isolat bakteri menggunakan ose bulat dan diinokulasikan pada media MR-VP dalam tabung reaksi. Selanjutnya diinkubasi selama 3 x 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, kemudian ditambahkan 0,2 mL KOH 40% dan 0,6 mL alfa-naftol lalu dikocok selama 30 detik. Hasil positif jika media berubah dari warna kuning menjadi warna merah lembayung yang menandakan bahwa bakteri melakukan fermentasi 2,3 butanodiol.

c. Uji SCA (*Simmon Citrat Agar*)

Diambil isolat bakteri menggunakan ose bulat dan diinokulasikan pada media SCA menggunakan ose bulat dengan metode gores sinambung, selanjutnya diinkubasi selama 1 x 24 jam pada 37°C. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna media dari hijau menjadi biru. Hal ini menandakan bahwa bakteri menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon.

d. Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Diambil isolat bakteri menggunakan ose lurus dan diinokulasikan isolat bakteri pada media TSIA dengan metode tusuk pada daerah *butt* dan gores sinambung pada daerah *slant*. Bakteri diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Hasil

positif ditandai dengan perubahan media dari merah menjadi kuning yang menandakan isolat bakteri memfermentasi gula (glukosa, sukrosa, dan laktosa) dengan hasil akhirnya berupa asam. Jika media terangkat, menandakan bahwa bakteri memproduksi gas CO_2 . Jika terbentuk endapan hitam pada dasar media menandakan bahwa bakteri mampu memproduksi H_2S .

e. Uji Katalase

Diambil isolat bakteri menggunakan ose bulat dan diulas pada kaca preparat. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes reagen H_2O_2 pada preparat. Hasil positif apabila terbentuk gelembung gas yang menandakan bahwa bakteri menghasilkan enzim katalase dan hasil negatif apabila tidak terbentuk gelembung gas.

2.3.8 Ekstraksi Isolat Bakteri Endosimbion

Isolat bakteri ditumbuhkan pada media TSB selama 2 x 24 jam. Kultur bakteri dilarutkan dengan etil asetat dengan perbandingan 1:1 kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya, diamkan hingga etil asetat dan lapisan kultur bakteri terpisah. Ekstrak etil asetat kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* selama 300 menit pada suhu 70°C hingga diperoleh ekstrak etil asetat bakteri yang kental.

2.3.9 Identifikasi Senyawa Bioaktif sebagai Kandidat Antibakteri melalui Analisis Kuantitatif dan Kualitatif

1. Analisis Kuantitatif menggunakan *Gas Chromatography and Mass Spectrometry* (GC-MS)

Hasil kultur isolat bakteri di *vortex* selama 1 menit dan disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 9000 rpm. Supernatan yang terbentuk dilanjutkan untuk pengujian GC-MS. Waktu diatur selama 60 menit dengan suhu injektor 260°C , detektor 250°C , dan kolom 325°C . Gas pembawa yang digunakan yaitu gas helium sebagai pembawa laju aliran konstan 1 mL/menit. Proses identifikasi menggunakan alat GC-MS menghasilkan beberapa senyawa-senyawa bioaktif dapat dilihat dari puncak kromatogram sebagai identifikasi data hasil kromatografi dan spektrometri massa (MS) dilihat dari spektrum massa dengan masing-masing berat molekul senyawa bioaktif.

2. Analisis Kualitatif menggunakan *Fourier Transform Infra Red Spectroscopy* (FTIR)

Sampel dibuat dengan menumbuk 250 KBr kemudian ditekan dalam cetakan hingga diperoleh pelet KBr. EPS kering dianalisa pada frekuensi $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Data yang didapatkan melalui uji FTIR berupa data kualitatif berupa keberadaan gugus fungsi dan jenis ikatan tertentu pada bilangan gelombang tertentu. Sedangkan data kuantitatif berupa absorbansi gugus fungsi yang terdeteksi.

2.4 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil uji aktivitas antibakteri, pengamatan morfologi, dan uji biokimia selanjutnya dianalisis secara deskriptif yang disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.