

Potential and Optimization of Antibiotic Production Isolate Bacteria Antibiosis *Bacillus* sp. Origin of Salt Liquid Waste of Anchovy (*Stolephorus* Sp.) Against Bacteria Test

Nurmiati Nurmiati^{1*}, Wahyu Dwisa Putra¹, Periadnadi Periadnadi¹

¹Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas Kota Padang, Indonesia;

Article History

Received : June 01th, 2024

Revised : July 11th, 2024

Accepted : July 23th, 2024

*Corresponding Author:

Nurmiati nurmiati,

Departemen Biologi, Fakultas
Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam, Universitas
Andalas, Kota Padang,
Indonesia;

Email:

nurmiati@sci.unand.ac.id

Abstract: Waste is one of the environmental problems that exists in every fish processing industry. Therefore, other ways are needed so that fish processing waste can be reused into something more useful. The use of waste that can be used is by using antagonistic microorganisms as antibiotic producing materials. The aim of this research is to determine the partial characteristics and potential of antibiosis bacteria and to obtain isolates that have antibiosis potential against *S. aureus* and *E. coli*. Determine the effect of the best substrate protein, the effect of the best incubation time, the effect of the best pH conditions, the effect of the best salinity levels, the effect of the best trace elements for *Bacillus* sp species isolates. in the production of antibiotics against the test bacteria *S. aureus* and *E. coli*. And determine the best optimization of salted anchovy water production media in the production of antibiotics against the test bacteria *S. aureus* and *E. coli*. The research method was carried out by survey and the results were presented descriptively. The results of this research obtained isolates of *Bacillus* sp. circular in shape, overall edges, raised elevation, and white in color. Basil cell form, motile bacteria, and has a Potential Antibiosis Index value of 1.95; Proteolytic Index 1.67; Fermentative 1.36; Amylolytic 1.18; Cellulolytic 1.79; and Lipolytic 1.26. Optimum conditions for the antibiosis bacterial isolate *Bacillus* sp. in producing antibiotics, namely on skim milk protein substrate, incubation time 16 hours, pH 6.73; trace element Zn, Salinity Content 5‰. The optimum condition for isolates in salted anchovy water media to produce antibiotics is at a salt content of 100% (11 ppt).

Keywords: Antibiotic, nchovy, *Bacillus* sp., optimization.

Pendahuluan

Limbah salah satu masalah lingkungan yang ada disetiap industri pengolahan ikan karena dapat mencemari, merusak kesehatan dan kelangsungan makhluk hidup disekitarnya. Sebesar 30%-40% produksi perikanan di Indonesia atau mencapai 8,6 juta ton pada 2021 menjadi limbah. Dari jumlah itu, sekitar 2 juta ton terbuang sebagai limbah yang tidak dimanfaatkan (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2022). Oleh sebab itu diperlukan cara lain agar limbah pengolahan ikan dapat dimanfaatkan kembali menjadi sesuatu yang lebih berguna. Pemanfaatan limbah yang dapat digunakan adalah dengan menggunakan

mikroorganisme antagonis sebagai bahan penghasil antibiotik.

Antibiotik dapat diproduksi secara langsung (*direct*) dan tidak langsung (*indirect*). Secara langsung antibiotik dapat diproduksi melalui metode tuang dengan mencampurkan bakteri uji dengan bakteri berpotensi antibiotik, selanjutnya melalui metode difusi kertas cakram. Secara tidak langsung melalui optimasi. Hasil dari optimasi akan membentuk produk berupa filtrat antibiotik, selanjutnya filtrat antibiotik akan dilakukan pengujian untuk melawan bakteri uji yang digunakan. Pengujian antibiotik menggunakan metode difusi pernah dilaporkan oleh Hettiarachchi *et al.*, (2017) yang menggunakan kertas cakram untuk pengujian

bakteri laut berpotensi antibiotik terhadap bakteri uji dan melihat daya hambat bakteri.

Bakteri genus *Bacillus* dapat menghasilkan beberapa jenis antibiotik Hansel (1980) menyatakan *B. brevis* menghasilkan *Gramicidine* dan *Tyrocidine*, *B. polymyxa* menghasilkan *Polymyxine*, sementara *B. subtilis* (*B. licheniformis*) menghasilkan *Bacitracine*. Genus *Bacillus* menghasilkan antibiotik dari asam amino golongan polipeptid (antibiotik *Tyrothricin*, *Tyrocidine* dan *Gramicidine*; *Bacitracine*, *Polymyxine*, *Viomycin*). Sementara, pembentukan antibiotik terjadi secara bioenergenik, secara intrinsik dipengaruhi faktor genetik, secara ekstrinsik melalui pengoptimasian substrat, temperatur, kadar O₂, pH media serta waktu fermentasi. Djaenuddin dan Muis (2015) menambahkan *B. subtilis* merupakan salah satu spesies dari bakteri genus *Bacillus*. Mekanisme penghambatan bakteri antagonis *B. subtilis* terjadi melalui antibiosis, persaingan, dan pemacu pertumbuhan. *B. subtilis* menghasilkan antibiotika yang bersifat racun terhadap mikroba lain. *Bacitracine* merupakan polipeptida yang efektif terhadap bakteri gram positif dan bekerja menghambat pembentukan dinding sel.

Beberapa penelitian yang pernah dilakukan menunjukkan bahwa produksi antibiotik yang dapat melawan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti pH, waktu inkubasi dan media. Penelitian Wulandari dan Sulistyani (2016) memperoleh hasil bahwa cairan kultur isolat Actinomycetes kode AL35 mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Pemanenan antibiotik yang optimal dapat dilakukan pada inkubasi hari ke-2 berdasarkan uji aktivitas terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. pH optimum untuk penghambatan terhadap *S. aureus* pada pH 9 dan untuk penghambatan terhadap *E. coli* pada pH 6. Penelitian selanjutnya tentang pengaruh waktu inkubasi bakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang resisten terhadap *Methicillin* yaitu *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

Penelitian Warsi dan Sulistyani (2018) melaporkan bahwa hasil optimasi produksi metabolit sekunder menunjukkan bahwa hari kedua merupakan waktu inkubasi terbaik untuk memanen antibiotik. Isolat bakteri dari limbah cair pengolahan ikan teri yang berpotensi

antibiosis terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* dari limbah cair pencucian dan perebusan telah dilakukan sebelumnya. Ada 14 isolat yang ditemukan dengan rata-rata memiliki daya hambat sedang hingga kuat dan rata-rata isolat yang diperoleh berasal dari genus *Bacillus*. (Putri et al., 2022). Penelitian ini isolat yang diambil berasal dari limbah cair yang telah ditambahkan garam sebelumnya.

Bahan dan Metode

Tempat dan waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Andalas Padang. Adapun penelitian ini dilakukan pada bulan Desemberr 2023 hingga Mei 2024.

Rancangan penelitian atau model

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode survey yang hasilnya disajikan secara deskriptif. Metode survey yang digunakan dalam mengoptimasikan produksi antibiotik diantaranya masing-masing substrat, waktu inkubasi, pH, dan *Trace element* yang berbeda dalam produksi antibiotik dari isolat potensial antibiosis Isolat genus *Bacillus sp.* asal limbah cair pengolahan ikan teri (*Stolephorus sp.*) terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Bakteri uji yang digunakan diperoleh dari Laboratorium Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Barat. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel, grafik dan diagram.

Alat dan bahan

Alat-alat berupa autoclave, timbangan analitik, cawan petri, erlenmeyer, testube, vortex, jarum ose, pH meter, tabung reaksi, gelas ukur, bunsen, corong, pipet tetes, hot plate, magnetic stirrer, incubator, plastic wrap, cutton bud, eppendorf, kertas label, kertas merang, sprayer, box, tissue, kapas, kain kasa, shaker, sarung tangan, masker, dan alat tulis. Bahan-bahan berupa alkohol 70 %, spiritus dan aquadest, kontrol berupa antibiotik Kloramfenikol, isolat potensial antibiosis; genus *Bacillus sp.*

Tahapan Penelitian

Pengambilan sampel di lapangan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah cair Sentral Pengolahan

Perikanan Pasie Nan Tigo (SP3N) Kota Padang. Sampel dimasukkan ke dalam botol sampel, kemudian dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi FMIPA, Universitas Andalas Padang dan diukur kadar salinitas dan pH sampel tersebut

Tahap persiapan

Sterilisasi Peralatan

Seluruh alat dan bahan yang akan digunakan, disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15-20 menit untuk mencegah kontaminasi sehingga peralatan dan pelaksanaan penelitian lebih steril. Sedangkan pinset dan jarum ose disterilkan dengan cara dipijarkan diatas nyala api lampu spritus selama beberapa saat, *ependorf* disterilkan dengan cara direndam dengan alkohol 70% selama semalam.

Medium

Medium Pemeliharaan (Medium *Nutrient Agar/NA*)

Medium *NA* merupakan medium untuk melihat keberadaan bakteri. Medium ini dibuat dengan menimbang sebanyak 5 gram kemudian dilarutkan dalam 250 ml *aquadest* di dalam *erlenmeyer*, lalu dipanaskan dengan suhu 100°C dan disterilkan (Raffles *et al.* 2015).

Medium Antibiotik

Medium antibiotik merupakan medium yang dapat memproduksi antibiotik. Antibiotik yang berasal dari genus *Bacillus* dapat diproduksi dengan medium yang mengandung asam amino, hal ini dikarenakan antibiotik *Gramicidine*, *Tyrocidine*, *Polymyxine* dan *Bacitracine* berasal dari asam amino golongan polipeptid/oligopeptid (Hansel, 1980).

Medium antibiotik yang digunakan terdiri atas glukosa ditambah pepton, serta beberapa substrat protein berbeda digunakan untuk produksi antibiotik, Susu Skim (SK), Susu Kedelai Tepung (KD), Kuning Telur (KT), Substrat Pepton (P). Berbagai substrat yang berbeda dibuat dengan komposisi sebagai berikut:

Substrat SK

Substrat ini dibuat dengan komposisi 10 % dari volume (5 g susu skim bubuk dalam 50 ml *aquadest*), lalu substrat dipanaskan sambil diaduk sampai homogen dan disterilkan

Substrat KD

Substrat ini dibuat dengan komposisi 10 % dari volume (5 g susu kedelai tepung dalam 50 ml *aquadest*), lalu substrat dipanaskan sambil diaduk sampai homogen dan disterilkan.

Substrat KT

Substrat kuning telur dibuat dengan perbandingan komposisi kuning telur dan *aquadest* 1 : 3, lalu substrat dipanaskan sampai homogen dan disterilkan.

Substrat P

Substrat ini dibuat dengan komposisi 10 % dari volume (5 g pepton dalam 50 ml *aquadest*), substrat dipanaskan sambil diaduk sampai homogen, disterilkan.

Isolasi Bakteri dari Limbah Cair Bergaram Pengolahan Ikan Teri

Isolasi bakteri dimulai dengan pengambilan 1 ml limbah cair bergaram pengolahan perikanan, kemudian sampel dimasukkan kedalam testube yang berisi 9 ml *aquades* steril lalu dihomogenkan (pengenceran 10⁻¹). Kemudian diambil 0,1 ml suspensi contoh dari pengenceran 10⁻¹ dan 9,9 ml suspensi bakteri uji *S. aureus* dan *E.coli* yang telah disetarakan dengan larutan Mc Farland's 0,5. Masing-masing isolat dicampur satu sama lain dan dituang kedalam cawan petri steril, lalu ditanam secara *Pour Plate* pada medium *Nutrient Agar (NA)*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Noor, 2021). Isolasi dilakukan terhadap bentuk koloni yang paling banyak muncul dan zona bening paling besar. Isolasi dimurnikan, diisolasi kembali dengan membuatkan biakan miring menggunakan medium *Nutrient Agar (NA)*.

Persiapan Starter Induk (Starter I dan Starter II)

Starter isolat potensial antibiosis genus *Bacillus sp* dibuat dengan mengambil gerusan Isolat genus *Bacillus sp* sebanyak 1 ose, dimasukkan kedalam media biakan cair yang terdiri dari 1 g glukosa ditambah 1 g pepton pada 100 ml larutan (Meevootisom, *et. al.*, 1983), dihomogenkan menggunakan *vortex*, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil starter yang telah diinkubasi dinamakan starter I. Selanjutnya dibuat starter II dengan mengambil starter I sebanyak 5% (dosis starter), dimasukkan ke dalam

erlenmeyer yang berisi media biakan cair yang terdiri dari 1 g glukosa ditambah 1 g pepton dicukupkan volumenya menjadi 100 ml (Meevootisom, et. al, 1983), diinkubasi di dalam inkubator goyang (*shaker*) pada suhu kamar (28°C), kecepatan 120 rpm selama 24 jam.

Produksi Filtrat Antibiotik

Dilakukan dengan mengambil 10 ml starter II dan dimasukkan ke dalam berbagai substrat protein terdiri dari Susu Skim (SK), Susu Kedelai Tepung (KD), Kuning Telur (KT) dan Pepton (P) yang telah disediakan sebelumnya dan diinkubasi di dalam inkubator goyang (*shaker*) pada suhu kamar (28°C) dengan kecepatan 120 rpm dengan periodik waktu yang berbeda. Hasil *shaker* diambil secara periodik per 4 jam selama 5 kali pengambilan, disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dan supernatan (filtrat antibiotik) yang terbentuk dapat digunakan untuk pengujian selanjutnya pada tahap optimasi dengan diuji aktivitas antibiotik menggunakan metode difusi dengan kertas cakram.

Tahap pelaksanaan

Optimasi Berbagai Substrat Protein Dalam Produksi Filtrat Antibiotik Terhadap Bakteri Uji

Penggunaan berbagai substrat (Susu skim, Kedelai, Kuning Ttelur, Pepton) dalam produksi filtrat antibiotik terhadap bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli* dilakukan untuk mendapatkan substrat protein terbaik yang ditandai dengan terbentuknya Daya Hambat (DH) filtrat antibiotik yang terbesar. Perlakuan ini dilakukan dengan mencelupkan kertas cakram ke dalam supernatan yang terbentuk pada berbagai substrat, selanjutnya ditanam pada cawan petri steril yang telah diisi medium *Nutrient Agar* (NA) dan telah digores dengan bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli* lalu diinkubasi. Perlakuan ini dilakukan dengan 3 ulangan.

Optimasi Waktu Inkubasi Pada Substrat Protein Terbaik (Susu Skim) Dalam Produksi Filtrat Antibiotik Terhadap Bakteri Uji

Optimasi berbagai waktu inkubasi yang berbeda pada substrat susu skim sebagai substrat protein terbaik dalam produksi filtrat antibiotik terhadap bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli* dilakukan untuk memperoleh waktu inkubasi terbaik pada substrat Susu Skim (SK) yang

ditandai dengan terbentuknya Daya Hambat (DH) filtrat antibiotik terbesar. Perlakuan ini dilakukan dengan mencelupkan kertas cakram ke dalam supernatan yang terbentuk dengan periodik waktu yang berbeda, ditanam pada cawan petri steril yang telah diisi medium *Nutrient Agar* (NA) dan telah digores dengan bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli* lalu diinkubasi. Perlakuan ini dilakukan dengan 3 ulangan.

Optimasi pH Substrat Susu skim; Waktu inkubasi terbaik (16 jam) Dalam Produksi Filtrat Antibiotik Terhadap Bakteri Uji

Optimasi pH substrat terbaik, produksi filtrat antibiotik terhadap bakteri uji dilakukan dengan mengambil 5 ml starter II dan dibuat perbedaan pH. Pengujian ini dilakukan dengan membuat perbedaan beberapa nilai pH yang berbeda (< 1 pH substrat protein terbaik, < 0,5 pH substrat protein terbaik, pH substrat substrat protein terbaik, > 0,5 pH substrat protein terbaik dan > 1 pH substrat substrat protein terbaik). Pada substrat protein terbaik yang diperoleh pada tahapan sebelumnya, lalu diinkubasi di dalam inkubator goyang (*shaker*) pada suhu kamar (28°C) dengan kecepatan 120 rpm yang waktunya sesuai dengan waktu inkubasi terbaik dari tahapan sebelumnya. Selanjutnya hasil inkubasi pH berbeda disentrifus sehingga terpisah antara supernatan dan *crude*. Lalu, kertas cakram dicelupkan ke dalam supernatan (filtrat antibiotik) dengan substrat pada waktu inkubasi terbaik pada pH berbeda, ditanam pada cawan petri steril yang telah diisi medium *Nutrient Agar* (NA) dan telah digores dengan bakteri uji *S.aureus* dan *E.coli* lalu diinkubasi. Perlakuan ini dilakukan dengan 3 ulangan.

Optimasi Trace Element Dalam Substrat susu skim; Waktu inkubasi 16 jam pH terbaik dalam Produksi Filtrat Antibiotik Terhadap Bakteri Uji

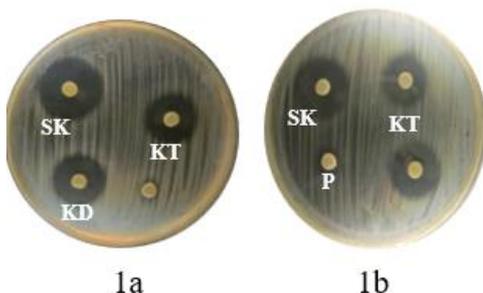
Optimasi *Trace Element* Dalam Substrat susu skim, waktu inkubasi 16 jam, dan pH terbaik Produksi Filtrat Antibiotik Terhadap Bakteri Uji dilakukan dengan menggunakan 4 Zat mineral yang berbeda yaitu Kalsium (Ca), Magnesium (Mg), Kalium (K), dan Zinc (Zn) masing masing 0,01 g (Grahovac et al., 2015) lalu diinkubasi di dalam inkubator goyang (*shaker*) pada suhu kamar (28°C) dengan kecepatan 120 rpm yang waktunya sesuai dengan waktu inkubasi terbaik dari tahapan sebelumnya. Selanjutnya hasil dari

inkubasi *Trace element* disentrifus sehingga terpisah antara supernatan dan *crude*. Lalu, kertas cakram dicelupkan ke dalam supernatan (filtrat antibiotik), ditanam pada cawan petri steril yang telah diisi medium *Nutrient Agar (NA)* dan telah digores dengan bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli* lalu diinkubasi. Perlakuan ini dilakukan dengan 3 ulangan (Agustien, 2010).

Hasil dan Pembahasan

Optimasi berbagai substrat protein dalam produksi filtrat antibiotik terhadap bakteri uji

Berbagai substrat protein memberikan pengaruh terhadap DH yang terbentuk. Dari semua substrat protein, beberapa dapat membentuk DH tinggi, sedang dan bahkan tidak dapat membentuk DH. Berdasarkan Gambar 14, didapatkan hasil bahwa substrat Susu Skim (SK) terindikasi sebagai substrat berprotein terbaik dalam produksi filtrat antibiotik terhadap dua bakteri uji, hal ini dikarenakan terbentuknya DH filtrat antibiotik terbesar pada substrat Susu Skim dalam menghambat pertumbuhan dua bakteri uji. Selanjutnya dilakukan pengukuran diameter DH filtrat antibiotik masing-masing substrat protein pada waktu inkubasi yang sama (24 jam) dari pengujian ini yang hasilnya disajikan dalam bentuk diagram pada gambar 5.

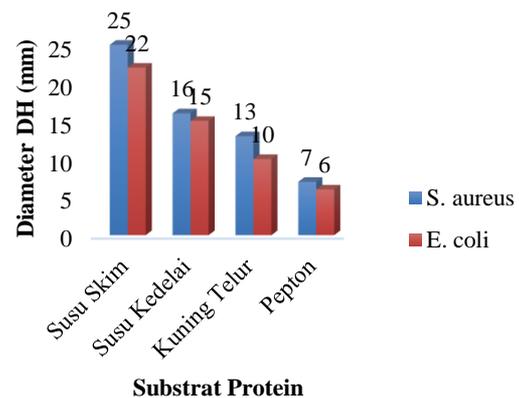


Gambar 1. Diameter Daya Hambat (DH) Filtrat Antibiotik dari Berbagai Substrat Protein Terhadap Bakteri Uji.

Keterangan: 1a. *S. aureus*; 14b. *E. Coli*; SK = Susu Skim; KD = Susu Kedelai; P = Pepton; KT = Kuning Telur

Berdasarkan Diagram, terlihat bahwa terbentuknya DH filtrat antibiotik terhadap bakteri uji. Hal ini mengindikasikan bahwa beberapa substrat protein dapat membentuk antibiotik pada bakteri genus *Bacillus sp.* yang diinterpretasikan dengan terbentuknya DH filtrat

antibiotik terhadap bakteri uji. DH terbentuk dari daerah resapan filtrat antibiotik di kertas cakram dapat melawan bakteri uji. Hasil pengujian pada bakteri uji *S. aureus* didapatkan substrat Susu Skim (SK) memiliki nilai diameter DH filtrat antibiotik tertinggi sebesar 25 mm. Selanjutnya, diikuti oleh substrat Susu Kedelai (KD) dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik 16 mm. Lalu, diikuti oleh substrat Kuning Telur (KT) dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik sebesar 13 mm. Diikuti lanjut oleh substrat Pepton dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik sebesar 7 mm. Kontrol menggunakan antibiotik Kloramfenikol dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik sebesar 38 mm terhadap bakteri uji *S. aureus*.



Gambar 2. Diagram Diameter Daya Hambat (DH) Filtrat Antibiotik dari Beberapa Substrat Protein Terhadap Bakteri Uji

Pengujian di bakteri uji *E. coli* didapatkan hasil bahwa substrat Susu Skim (SK) memiliki nilai diameter Daya Hambat (DH) filtrat antibiotik tertinggi sebesar 22 mm. Selanjutnya, diikuti oleh substrat Susu Kedelai (KD) dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik 15 mm. Lalu, diikuti oleh substrat Kuning Telur (KT) dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik sebesar 10 mm. Diikuti lanjut oleh substrat Pepton dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik sebesar 6 mm. Kontrol menggunakan antibiotik Kloramfenikol dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik sebesar 35 mm terhadap bakteri uji *E. coli*.

Tinggi rendahnya Daya Hambat (DH) yang terbentuk disebabkan oleh adanya pengaruh dari perbedaan berbagai substrat protein untuk pertumbuhan filtrat antibiotik dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji dan juga disebabkan oleh adanya perbedaan kandungan

protein dari masing-masing substrat sehingga asam amino yang terkandung dalam substrat berprotein pun juga berbeda.

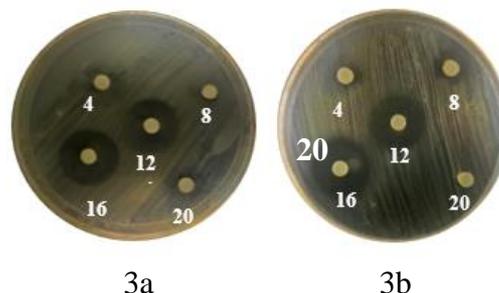
Kandungan protein pada masing-masing substrat berbeda dapat dipengaruhi oleh volume substrat yang berbeda. Pada pengujian ini menggunakan Susu Skim (SK) kemasan 1000 g, dimana pada kemasan ini memiliki kandungan protein sebanyak 0,8 % sementara volume Susu Skim (SK) yang digunakan untuk pengujian ini sebesar 5 g, dimana pada volume ini memiliki kandungan protein sebanyak 0,004 %. Selanjutnya, Susu Kedelai (KD) yang digunakan berkemasan 200 g, dimana pada kemasan ini memiliki kandungan protein sebanyak 7,5 %, sementara volume Susu Kedelai (KD) yang digunakan untuk pengujian ini sebesar 5 g, dimana volume 5 g memiliki kandungan protein sebanyak 0,18 %.

Kuning Telur yang digunakan memiliki volume 12,5 g, dimana volume tersebut memiliki kandungan protein sebesar 2,16 % dan Pepton yang digunakan bervolume 5 g. Namun, tingginya kandungan protein tidak dapat menjamin terbentuknya Daya Hambat (DH) yang besar, dikarenakan jenis asam amino pada protein dalam masing-masing substrat juga berbeda. Kasein pada susu memiliki empat jenis polipeptida ($\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β -, κ -kasein) dengan beberapa variasi genetik. κ -Kasein merupakan salah satu dari fraksi kasein yang mempengaruhi bentuk dan kestabilan susu, sehingga dapat berfungsi sebagai penentu ukuran dan fungsi butiran susu. Protein κ -Kasein pada susu Sapi tersusun atas 169 asam amino (Sumantri, *et al.*, 2008).

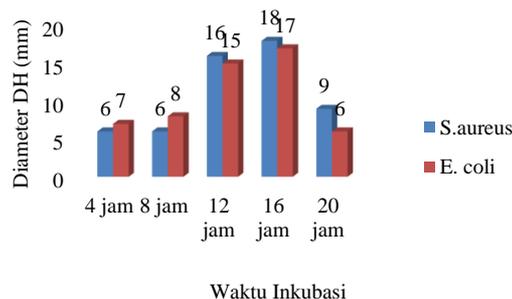
Optimasi waktu inkubasi pada substrat protein terbaik (susu skim) dalam produksi filtrat antibiotik terhadap bakteri uji

Berbagai waktu inkubasi yang berbeda pada substrat protein terbaik (Susu Skim) berpengaruh terhadap Daya Hambat (DH) yang terbentuk. Dari semua waktu inkubasi, beberapa dapat membentuk DH tinggi, sedang dan bahkan tidak dapat membentuk DH. Berdasarkan Gambar 16, didapatkan hasil bahwa substrat Susu Skim (SK); waktu inkubasi 16 jam terindikasi sebagai waktu inkubasi terbaik dalam produksi filtrat antibiotik terhadap dua bakteri uji, hal ini dikarenakan terbentuknya DH filtrat antibiotik terbesar pada waktu inkubasi 16 jam

dibandingkan waktu inkubasi lainnya dalam menghambat pertumbuhan dua bakteri uji. Pengukuran diameter DH filtrat antibiotik berbagai waktu inkubasi dari pengujian, hasilnya disajikan dalam bentuk diagram pada gambar 4.



Gambar 3. Diameter Daya Hambat (DH) Filtrat Antibiotik Pada berbagai Waktu Inkubasi; Substrat Susu Skim (SK) Terhadap Bakteri Uji
Keterangan : 3a. *S. aureus*; 16b. *E. Coli*; 4 = Waktu Inkubasi 4 jam; 8 = Waktu Inkubasi 8 jam; 12 = Waktu Inkubasi 12 jam; 16 = Waktu Inkubasi 16 jam; 20 = Waktu Inkubasi 20 jam



Gambar 4. Diagram Diameter Daya Hambat (DH) Filtrat Antibiotik; Substrat Susu Skim (SK) Pada Beberapa Waktu Inkubasi Terhadap Bakteri Uji

Berdasarkan diagram, pada bakteri uji *S. aureus* didapatkan hasil bahwa substrat SK; waktu inkubasi 16 jam memiliki nilai diameter DH bakteri tertinggi sebesar 18 mm. Selanjutnya, diikuti oleh waktu inkubasi 12 jam dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik sebesar 16 mm. Lalu, diikuti oleh waktu inkubasi 20 jam dengan nilai diameter DH bakteri sebesar 9 mm. Pada waktu inkubasi 4 jam dan 8 jam tidak dapat membentuk diameter DH filtrat antibiotik dikarenakan tidak memiliki diameter DH filtrat antibiotik, namun hanya diameter kertas cakram saja yang terbentuk sebesar 6 mm dimana diameter ini diperoleh dengan menambahkan 1 mm (dikarenakan memberikan diameter dan tidak tumbuh bakteri uji) dengan 5 mm diameter

kertas cakram serta permukaan kertas cakram yang bersih dari bakteri uji.

Pengujian di bakteri uji *E. coli* didapatkan hasil bahwa substrat Susu Skim (SK); waktu inkubasi 16 jam memiliki nilai diameter Daya Hambat (DH) filtrat antibiotik tertinggi sebesar 17 mm. Waktu inkubasi 12 jam memiliki nilai diameter DH filtrat antibiotik yang sama sebesar 15 mm. Pada waktu inkubasi 4 dan 8 jam berturut turut memiliki nilai diameter Daya Hambat 7 dan 8 mm (DH) pada waktu inkubasi 20 jam tidak dapat membentuk DH filtrat antibiotik, namun hanya diameter kertas cakram saja yang terbentuk sebesar 6 mm dimana diameter ini diperoleh dengan menambahkan 1 mm (dikarenakan memberikan diameter dan tidak tumbuh bakteri uji) dengan 5 mm diameter kertas cakram serta permukaan kertas cakram yang bersih dari bakteri uji. Hal ini mengindikasikan bahwa tidak adanya kemampuan filtrat antibiotik dari isolat potensial antibiosis Genus *Bacillus* pada waktu inkubasi dan 20 jam dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji *Escherichia coli*.

Tingginya diameter Daya Hambat (DH) filtrat antibiotik yang terbentuk pada jam ke 16 disebabkan filtrat antibiotik dari isolat potensial antibiosis Genus *Bacillus* akan mengakhiri fase logaritma (fase log) dan akan memasuki fase stasioner. Hal ini didukung oleh pernyataan Rohan, *et al.* (2016) menyatakan bahwa pada fase logaritmis (fase log) jumlah bakteri bertambah dengan cepat dan bermultiplikasi 1 menjadi 4 dan seterusnya. Sedangkan yang berkembang berupa bakteri pilihan, jumlah makan dan lingkungan masih bersih tetapi fase ini memuncak dikarenakan zat sisa makanan semakin berkurang sedangkan bakteri butuh makan dan sisa metabolit yang beracun semakin bertambah. Setelah itu bakteri memasuki fase stasioner, dimana pada fase ini jumlah bakteri tidak bertambah atau berkurang. Pada fase stasioner terjadi perjuangan bakteri mempertahankan jumlahnya, terjadi perebutan makanan dan perjuangan untuk menghadapi sisa metabolit yang beracun.

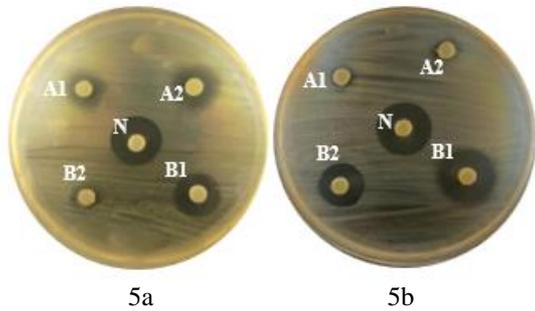
Waktu inkubasi 16 jam, filtrat antibiotik akan memasuki fase stasioner, saat akan memasuki fase stasioner ini filtrat antibiotik akan membentuk metabolit sekunder berupa antibiotik sehingga terbentuk Daya Hambat (DH) filtrat antibiotik yang besar. Hal ini sesuai dengan

pernyataan Triandini dan Suryadi (2018) menyatakan bahwa pada saat bakteri memasuki fase stasioner, kebutuhan bakteri akan medium tidak cukup sehingga metabolit sekunder yang bersifat toksik disekresikan ke lingkungan medium. Dengan adanya metabolit sekunder ini, maka berpotensi sebagai senyawa yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain. Metabolit sekunder yang terakumulasi menyebabkan pertumbuhan bakteri terhambat, tetapi pembelahan sel masih mungkin terjadi.

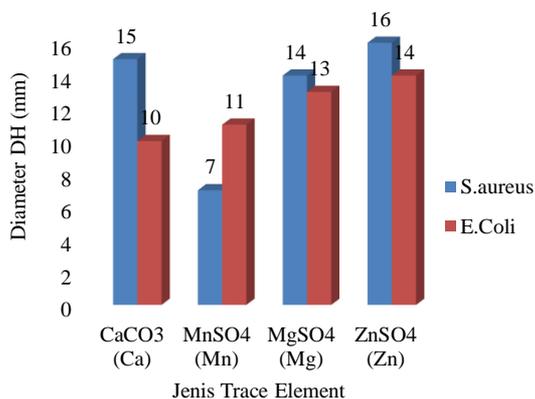
Daya Hambat (DH) filtrat antibiotik yang terbentuk pada waktu inkubasi 16 jam pada medium *Nutrient Agar* (NA) bertujuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji sehingga bakteri pada filtrat antibiotik dapat mempertahankan hidupnya. Hal ini didukung oleh pernyataan Brock dan Madigan (1991) menyatakan bahwa mikroorganisme memproduksi metabolit sekunder bertujuan untuk mempertahankan keberadaannya dan produksinya dimulai ketika pertumbuhan selnya menjelang memasuki fase stasioner. Antibiotika merupakan salah satu bentuk senyawa metabolit segkunder di samping pigmen, alkaloid, dan flavonoid.

Optimasi pH Substrat Susu Skim (SK); Waktu Inkubasi Terbaik (16 Jam) Dalam Produksi Filtrat Antibiotik Terhadap Bakteri Uji

Berbagai pH pada substrat Susu Skim (SK) dan waktu inkubasi (16 jam) terbaik berpengaruh terhadap Daya Hambat (DH) yang terbentuk. Dari semua pH berbeda, beberapa dapat membentuk DH tinggi, sedang dan bahkan tidak dapat membentuk DH. Berdasarkan Gambar 18, didapatkan hasil bahwa substrat SK; waktu inkubasi 16 jam; pH 6,73 terindikasi sebagai pH terbaik dalam produksi filtrat antibiotik terhadap dua bakteri uji, hal ini dikarenakan terbentuknya DH filtrat antibiotik terbesar pada pH 6,73 dibandingkan pada pH lainnya dalam menghambat pertumbuhan dua bakteri uji. Selanjutnya dilakukan pengukuran diameter DH filtrat antibiotik berbagai pH substrat dari pengujian ini yang hasilnya disajikan dalam bentuk diagram pada gambar 6.



Gambar 5. Diameter Daya Hambat (DH) Filtrat Antibiotik Pada Berbagai pH Terhadap Bakteri Uji. Keterangan : 5a. *S. aureus*; 18b. *E. Coli*; A1 = pH 5,23; B1 = pH 6,73; A2= pH 5,73; B2 = pH 7,23; N = pH 6,23



Gambar 6. Diameter Daya Hambat (DH) Filtrat Antibiotik Pada Berbagai pH Terhadap Bakteri Uji

Berdasarkan diagram, pada bakteri uji *S. aureus* didapatkan hasil bahwa substrat Susu Skim (SK); waktu inkubasi 16 jam; pH 6,73 memiliki nilai diameter DH filtrat antibiotik tertinggi sebesar 14 mm. Selanjutnya, diikuti oleh pH 6,23 dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik sebesar 12 mm. Lalu, diikuti oleh pH 5,73 dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik sebesar 10 mm. Pada pH 5,23 dan pH 7,23 tidak dapat membentuk DH filtrat antibiotik, namun hanya diameter kertas cakram saja yang terbentuk sebesar 7 dan 6 mm dimana diameter ini diperoleh dengan menambahkan 1 mm (dikarenakan memberikan diameter dan tidak tumbuh bakteri uji) dengan 5 mm diameter kertas cakram serta permukaan kertas cakram yang bersih dari bakteri uji. Hal ini mengindikasikan bahwa filtrat antibiotik sulit membentuk DH pada suasana asam yang tinggi dan basa yang tinggi.

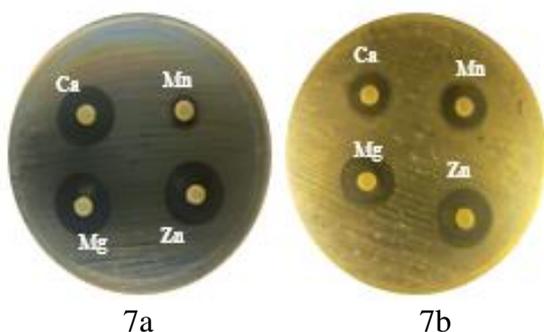
Bakteri uji *E. coli* didapatkan hasil bahwa substrat Susu Skim (SK); waktu inkubasi 16 jam; pH 6,73 memiliki nilai diameter Daya Hambat (DH) filtrat antibiotik tertinggi sebesar 15 mm. Selanjutnya, diikuti oleh pH 6,23 dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik sebesar 13 mm. Selanjutnya pH 7,23 dengan nilai diameter DH 9 mm. Terakhir, diikuti oleh pH 5,23, pH 5,73 dan tidak dapat membentuk DH filtrat antibiotik, namun hanya diameter kertas cakram saja yang terbentuk sebesar 6 mm dimana diameter ini diperoleh dengan menambahkan 1 mm (dikarenakan memberikan diameter dan tidak tumbuh bakteri uji) dengan 5 mm diameter kertas cakram serta permukaan kertas cakram yang bersih dari bakteri uji.

Didukung oleh pernyataan Rohan, *et al.* (2016) menyatakan bahwa pH yang asam mempunyai pengaruh buruk terhadap pertumbuhan bakteri. Kebanyakan dari bakteri dapat tumbuh baik pada pH netral (7,0) atau sedikit basa (pH 7,2-7,4) tetapi umumnya dapat hidup pada pH 6,5-7,5. Pada tubuh manusia bakteri dapat tumbuh baik pada pH 6,8-7,4 yaitu setara dengan pH darah dan beberapa bakteri dapat tumbuh pada pH suasana asam. pH (potensial Hidrogen) yang diperoleh dari filtrat antibiotik dari isolat potensial antibiosis (Isolat Genus *Bacillus*) berhubungan dengan aktivitas kerja enzim dari substrat Susu Skim (SK) sebagai substrat protein terbaik yang diperoleh. Hal ini didukung oleh penelitian Rahayu dan Susanti (2017) menunjukkan hasil bahwa sumber nitrogen optimum untuk menghasilkan protease dari isolat H6.2. susu skim dan limbah cair tahu. Produksi protease cukup tinggi dan relatif konstan antara pH 6 sampai 8.

Perbedaan pH merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap produksi metabolit sekunder. Hal ini didukung oleh penelitian Augustine, *et al.* (2005) menyatakan bahwa Produksi metabolit diketahui dipengaruhi oleh media komponen dan berbagai kondisi, seperti aerasi, agitasi, pH, suhu dan gliserol konsentrasi, yang bervariasi dari organisme ke organisme. Perubahan pH kultur medium menginduksi produksi zat baru itu mempengaruhi produksi antibiotik.

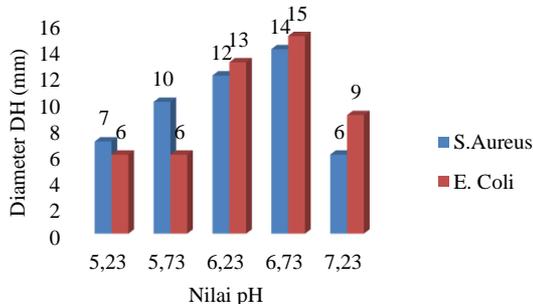
Optimasi trace element substrat susu skim; waktu inkubasi 16 jam; pH 6,73 dalam produksi filtrat antibiotik terhadap bakteri uji

Berbagai Trace element pada substrat Susu Skim (SK) waktu inkubasi (16 jam) dan pH (6,73) berpengaruh terhadap Daya Hambat (DH) yang terbentuk. Dari semua trace element berbeda, beberapa dapat membentuk DH sedang. Berdasarkan Gambar 20, didapatkan hasil bahwa substrat SK; waktu inkubasi 16 jam; pH 6,73; dan Trace element Zn terindikasi sebagai pH terbaik dalam produksi filtrat antibiotik terhadap dua bakteri uji, hal ini dikarenakan terbentuknya DH filtrat antibiotik terbesar pada trace element Zn dibandingkan pada trace element lainnya dalam menghambat pertumbuhan dua bakteri uji. Selanjutnya dilakukan pengukuran diameter DH filtrat antibiotik berbagai pH substrat dari pengujian ini yang hasilnya disajikan dalam bentuk diagram pada gambar 8.



Gambar 7. Diameter Daya Hambat (DH) Filtrat Antibiotik Pada Berbagai Trace Element Terhadap Bakteri Uji.

Keterangan :7a. *S. aureus*; 7b. *E. Coli*; Ca = Kalsium; Mn = Mangan; Mg = Magnesium; Zn = Zinc



Gambar 8. Diameter Daya Hambat (DH) Filtrat Antibiotik Pada Berbagai pH Terhadap Bakteri Uji

Berdasarkan diagram, pada bakteri uji *S. aureus* didapatkan hasil bahwa substrat Susu Skim (SK); waktu inkubasi 16 jam; pH 6,73; Trace element Zn memiliki nilai diameter DH filtrat antibiotik tertinggi sebesar 14 mm. Selanjutnya, diikuti oleh trace element Mg dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik sebesar 13 mm. Lalu, diikuti oleh Trace element Mn dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik sebesar 11 mm. Dan terakhir trace element Ca dengan nilai diameter DH 10 mm. Hal ini mengindikasikan bahwa keempat jenis trace element memberikan pengaruh Daya Hambat (DH) dengan kekuatan sedang .

Bakteri uji *E. coli* didapatkan hasil bahwa substrat Susu Skim (SK); waktu inkubasi 16 jam; pH 6,73; Trace Element Zn memiliki nilai diameter Daya Hambat (DH) filtrat antibiotik tertinggi sebesar 16 mm. Selanjutnya, diikuti oleh trace element Mg dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik sebesar 14 mm. Selanjutnya trace element Ca dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik sebesar 15 dan terakhir yaitu trace element Mn dengan nilai diameter DH filtrat antibiotik 7 mm. Berdasarkan analisis data, trace element Zn merupakan trace element terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli* yang diperoleh dari tingginya nilai diameter Daya Hambat (DH) filtrat antibiotik yang terbentuk. Optimasi antibiotik oleh genus *Bacillus* dipengaruhi oleh berbagai trace element. Zn (seng) berperan dalam membentuk dan mempertahankan struktur tiga dimensi dari beberapa protein, serta dapat membantu bakteri bertahan dalam kondisi stres seperti lingkungan yang ekstrem. (Pujawati, 2012).

Penambahan beberapa jenis trace element memberikan pengaruh dalam produksi antibiotika isolat *Bacillus sp.* Trace element memainkan peran penting dalam mengoptimalkan produksi antibiotik. Unsur-unsur ini, meskipun dalam jumlah yang sangat kecil, penting untuk pertumbuhan, metabolisme, dan produktivitas mikroorganisme yang terlibat dalam sintesis antibiotik. Penelitian (Zheng *et al.*, 2017) telah menunjukkan bahwa unsur-unsur seperti Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, dan B memainkan peran penting dalam produksi antibiotik oleh *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus*. Mn dan Fe secara individual atau dalam kombinasi

mempengaruhi pertumbuhan dan produksi antibiotik, dengan Cu memiliki dampak negatif pada produksi antibiotik bila dikombinasikan dengan Fe dan Mn. Selain itu, komposisi optimal trace element seperti magnesium, mangan, molibdenum, dan barium telah ditemukan untuk secara signifikan meningkatkan produksi antibiotik *Bacillus subtilis*.

Trace element sering bertindak sebagai kofaktor untuk enzim yang terlibat dalam jalur metabolisme. Misalnya, unsur-unsur seperti besi (Fe), mangan (Mn), seng (Zn), dan tembaga (Cu) merupakan bagian integral dari fungsi berbagai enzim yang mengkatalisis langkah-langkah dalam biosintesis antibiotik. Hal ini sesuai dengan pernyataan Gao *et al.*, (2018) yang menyatakan bahwa *trace element* adalah faktor nutrisi yang sangat diperlukan untuk metabolisme normal mikroorganisme. *Trace element* merupakan bagian dari pusat aktif berbagai enzim dan berpartisipasi dalam sintesis dan metabolisme zat dalam mikroorganisme. *Trace element* mempunyai pengaruh penting stabilitas biomakromolekul biologis dan sel struktur mikroorganisme; mengontrol reaksi redoks potensi sel; juga dapat berfungsi sebagai zat energi untuk perkembangbiakan mikroorganisme tertentu.

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian Potensi dan Optimasi Produksi Antibiotik Isolat Bakteri Antibiosis *Bacillus sp.* Asal Limbah Cair Bergaram Ikan Teri (*Stolephorus Sp.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Escherichia coli* yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa Kondisi optimum isolat bakteri antibiosis *Bacillus sp.* dalam memproduksi antibiotik yaitu pada substrat protein Susu skim, Waktu inkubasi 16 jam, pH 6,73; *trace element* Zn. Disarankan untuk melakukan pengujian secara molekuler untuk mengetahui jenis spesies isolat dan kelanjutan proses optimasi produk.

Referensi

Agustien, A. (2010). *Protease Bakteri Termofilik*. UNPAD PRESS. Bandung
Augustine, S. K., S. P. Bhavsar & B. P. Kapadnis (2005). Production of a growth dependent

metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK 39. *Indian J Med Res* 121, March 2005, pp 164-170.

Gao, Y., Liang, J., Xiao, R., Zang, P., Zhao, Y., & Zhang, L. (2018). Effect of four trace elements on *Paenibacillus polymyxa* Pp-7250 proliferation, activity and colonization in ginseng. *AMB Express*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0694-0>

Grahovac, J. A., Rončević, Z. Z., Tadijan, I., Jokic, A. I., & Dodic, J. M. (2015). Optimization of media for antimicrobial compounds production by *Bacillus subtilis*. *Acta Alimentaria*, 44(3), 427–435. <https://doi.org/10.1556/066.2015.44.0014>

Hansel, R. (1980). *Pharmazeutische Biologie*. Springer-Verlag Berlin Helderberg New York.

Hettiarachchi, S. A., S. J. Lee, Y. Lee, Y. K. Kwon, M. D. Zoysa, S. Moon, E. Jo, T. Kim, D. H. Kang, S. J. Heo & C. Oh. (2017). A Rapid and Efficient Screening Method for Antibacterial Compound Producing Bacteria. *Journal Microbiology Biotechnology* (2017), 27(8), 1441-1448.

Kementerian Kelautan dan Perikanan (2022). Pemanfaatan Limbah Perikanan Wujudkan Konsep Ekonomi Biru. Dirjen Pengolahan Daya Saing Produk Kelautan dan Perikanan (PDSPKP). Jakarta

Noor, R., A. Sutanto, H. Widowati, S. Zen & M. R. Rifai. (2021). Uji Antagonis Isolat Bakteri Indigen Limbah Cair Nanas (LCN) Dengan Isolat Bakteri Tanah Di Kebun Percobaan Karang Rejo Metro Utara. *Jurnal Bioedukasi* 12(1): 110-120.

Pujawati, S. (2012). Seleksi, Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik Pasca Erupsi Merapi Sebagai Penghasil Enzim Amilase. *Skripsi*. Program Studi Biologi Universitas Negeri Yogyakarta.

Putri S. G., (2022). Potensi Dan Karakterisasi Bakteri Antibiosis Dari Limbah Cair Pengolahan Ikan Teri (*Stolephorus sp.*) Di Sentral Pengolahan Perikanan Pasie Nan Tigo (SP3N) Kota Padang. (Thesis). FMIPA, Universitas Andalas

Rafles M., Nurmiati, & Periadnadi (2015). Potensi Antimikroba dan Antioksidan Ekstrak Segar Tanaman Dandelion (*Taraxacum officinale* F.H. Wigg.).

- Prosiding Seminar Nasional Biosains 2*. Universitas Udayana. Bali.
- Rahayu, M. & E., Susanti (2017). Optimasi Jenis dan Kadar Sumber Nitrogenserta pH Medium untuk Produksi Protease dari Isolat HTcUM6.2.2 dari Tauco Surabaya. *Jurnal Kimia Riset*, Volume 2 No. 2, Desember 2017.
- Rohan, H. H., K. Rokhmad, N. L. P. E. Sudiwati & I. R. Rohana. (2016). *Mikrobiologi Dasar. Edisi 1, Cetakan 1*. Deepublish. Yogyakarta.
- Sumantri, C., E. Andreas, A. Farajallah & Jarmuji. (2008). Keanekaragaman Gen κ -Kasein Dan Hubungannya Dengan Produksi Dan Kualitas Susu Pada Domba Di Unit Pendidikan Dan Penelitian Peternakan (UP3) Jonggol. *Jurnal Ilmu Pertanian*. ISSN 0853-4217.
- Triandini, I. G. A. A. H., & B. F. Suryadi (2018). Uji Aktivitas dan Produksi Antibakteri *Bacillus Lentus* yang Diisolasi dari Sistem Pencernaan Landak Laut Dalam Menghambat Bakteri Penyebab Infeksi Pada Kehamilan. *Jurnal Sangkareang Mataram* ISSN No. 2355-929.
- Warsi & N. Sulistyani (2018). Optimasi Waktu Produksi Metabolit Sekunder dan Skrining Aktivitas Antibakteri Isolat Actinomycetes Rizosfer Tanaman Tin (*Ficus carica*). *Jurnal Teknologi Laboratorium*. Vol.7, No.1, Maret 2018, pp. 15– 24 ISSN 2580-0191.
- Wulandari, S. & N. Sulistyani. (2016). Pengaruh Media terhadap Pertumbuhan Isolat Actinomycetes Kode A135 serta Optimasi Produksi Metabolit Antibakteri Berdasarkan Waktu Fermentasi dan pH. *Jurnal. Media Farmasi* Vol. 13 No. 2 September 2016 : 186-198.
- Zheng, Z., Li, W., Huang, X., & Qin, W. (2017). Effect of trace elements and optimization of their composition for the nitrification of a heterotrophic nitrifying bacterium, *Acinetobacter harbinensis* HITLi7T, at low temperature. *Annals of Microbiology*, 67(11), 715–725. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1298-7>