

Penapisan Aktivitas Antibakteri Dari Bakteri Asosiasi Spons Terhadap MRSA (*Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*)

Farrastasya Muflihul Azzami, Agus Trianto*, Agus Sabdono

Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto S.H, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah, 50275, Indonesia
*Corresponding author, e-mail: agustrianto.undip@gmail.com

ABSTRAK: Resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik menjadi masalah besar bagi dunia kesehatan. Bakteri *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotik yang dikenal dengan MRSA (*Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*). Bakteri MRSA mengalami resistensi antibiotik disebabkan oleh mutasi genetik yang disebabkan terapi antibiotik yang bersifat irasional. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen MRSA dengan tingkat infeksi yang bervariasi dapat terjadi pada jaringan lunak, tulang, organ pernapasan, serta jaringan endovaskuler yang menimbulkan indikasi berbagai penyakit seperti bronkitis, pneumonia, meningitis, dan sepsis. Masalah resistensi antibiotik dapat diatasi dengan pencarian antibiotik baru dengan eksplorasi bahan alam yang berasal dari laut seperti spons. Spons menyediakan tempat hidup utk bakteri simbiosis dan simbiosis membantu spons dlm proses nutrifikasi spons menghasilkan senyawa metabolit untuk perlindungan diri dari patogen dan prodatornya, kompetisi ekologis. Metabolit yang dihasilkan oleh spons merupakan hasil biosintesis sehingga bakteri asosiasinya memiliki komponen yang mirip dengan spons. Tujuan penelitian untuk mencari bakteri yang berasosiasi dengan spons yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen MRSA dan mengidentifikasi secara molekuler bakteri asosiasi spons tersebut. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratoris dengan melakukan pengujian aktivitas antibakteri dari bakteri yang berasosiasi dengan spons. Metode yang dilakukan yaitu purifikasi bakteri, penapisan aktivitas antibakteri dengan metode agar plug dan identifikasi molekuler isolat bakteri. Hasil dari penelitian ini didapatkan 2 isolat yang berasosiasi dengan spons yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap MRSA yaitu isolat RA-S20.4 dan RA-S20.5. Zona hambat isolat RA-S20.4 sebesar 8,3 mm dan isolat RA-S20.5 sebesar 9,6 mm. Hasil identifikasi isolat bakteri secara molekuler didapatkan bahwa isolat RA-S20.4 serta RA-S20.5 memiliki kekerabatan dekat dengan *Vibrio alginolyticus* sebesar 99,86% dan 99,65%.

Kata kunci: Antibakteri; Bakteri; MRSA; Spons; *V. alginolyticus*

Screening of Antibacterial Activity from Bacteria Associated Sponge Against MRSA (*Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*)

ABSTRACT: Pathogen bacteria resistance towards antibiotics have been a major problem in the medical field. The bacteria *Staphylococcus aureus* is known to be resistant to antibiotics known as MRSA. MRSA bacteria obtained their ability to be resistant towards antibiotics through gene mutations caused by irrational antibiotic application. MRSA are capable of causing diseases with various diseases such as bronchitis, pneumonia, meningitis, and sepsis. Antibiotic resistance can be overcome by discovering new antibiotics through exploration of marine natural products such as sponges. Marine sponges are hosts for various microbes such as bacteria, because they can protect microbes from predators by producing secondary metabolite. The metabolites that are produced by sponges are the result of biosynthesis, in which the bacteria that associated with these sponges have compounds similar to those of sponges. The purpose of this research is to discover bacteria associated with sponges that have antibacterial activity against MRSA pathogen bacteria, as well as to molecularly identify the sponge-associated bacteria. The activity in this study is bacterial isolation and purification, antibacterial screening activity, and molecular identification of bacterial isolates. Result shows that there are 2 isolates associated with sponges that have antibacterial activity against MRSA, namely isolate RA-S20.4 and RA-S20.5. The inhibition zone for isolate RA-S20.4 was 8,3 mm and isolate RA-S20.5 was 9,6 mm. The result of molecular

identification of bacterial isolates shows that RA-S20.4 and RA-S20.5 were closely related to *Vibrio alginolyticus* by 99.86% and 99.65%.

Keywords: Antibacterial; Bacteria; MRSA; Sponge; *V. alginolyticus*

PENDAHULUAN

Resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik telah menjadi masalah besar bagi dunia kesehatan (Negara, 2014). Resistensi suatu bakteri dapat terjadi karena pemberian antibiotik yang tidak tepat dosis, diagnosis yang salah, dan tidak tepat sasaran terhadap bakteri penyebabnya (Sugireng dan Lio, 2020). *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotik disebut MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). Bakteri MRSA dapat menyebabkan resistensi antibiotik akibat mutasi genetik karena penggunaan antibiotik yang tidak wajar (Sugireng dan Lio, 2020).

Staphylococcus aureus adalah flora normal pada kulit, tetapi bersifat patogen terhadap inang yang memiliki imun yang rentan. Bakteri ini dapat menyebabkan berbagai infeksi dengan tingkat keparahan yang berbeda pada jaringan lunak, jaringan tulang, organ pernapasan, dan jaringan intravaskular, yang mengarah pada penyakit, seperti bronkitis, pneumonia, meningitis dan sepsis (Nuryah *et al.*, 2019).

Menurut Samirudin *et al.* (2018), pemecahan masalah resistensi antibiotik adalah menemukan antibiotik baru dengan menggali bahan-bahan alami (seperti spons) dari laut. Spons merupakan salah satu hewan dari Filum Porifera, yang menjadi inang beberapa jenis mikroorganisme seperti bakteri. Mikroorganisme tersebut menyumbang 40% dari biomassa spons. Kombinasi mikroorganisme yang beragam dan melimpah diduga dapat dijadikan sumber senyawa yang aktif secara biologis (Liempepas *et al.*, 2019). Namun, apabila senyawa bioaktif didapatkan dengan cara isolasi secara terus-menerus maka dikhawatirkan akan menimbulkan permasalahan dalam ketersediaan bahan baku. Terdapat beberapa strategi untuk mengatasi permasalahan tersebut misalnya dengan isolasi senyawa bioaktif dari mikroba (Wewengkang *et al.*, 2014). Senyawa yang dihasilkan oleh spons merupakan hasil biosintesis bakteri asosiasinya sehingga bakteri tersebut memiliki sifat yang mirip dengan spons (Taylor *et al.*, 2011).

Yondelis adalah produk obat yang disetujui beredar di Uni Eropa pada Oktober 2007. Obat tersebut merupakan senyawa aktif dari marine natural product pertama yang beredar di pasaran (Molinski *et al.*, 2009). Obat tersebut berisi senyawa bioaktif ecteinascidin ET-743 yang pada awalnya diisolasi dari tunikata *Ecteinascidia turbinata* atau dikenal juga dengan trabectedin yang memiliki aktivitas antikanker. Saat ini senyawa yang diisolasi dari spons *Discodermia dissoluta* seperti *Discodermolide* berada pada tahap uji klinik fase I dan sudah 3 dilisensikan pada Novartis oleh Harbor Branch Oceanographic Institution sebagai antikanker (Wibowo, 2014).

Penemuan senyawa dari bahan alam untuk pembuatan obat memerlukan tahapan yang panjang dari uji aktivitas biologis, ekstraksi, fraksinasi, pemurnian senyawa dan penentuan struktur senyawa. Setelah senyawa aktif diisolasi dan dielusidasi strukturnya maka dilihat dari sisi komersilnya apakah dapat disintesis, semi sintesis atau tetap harus diproduksi dari bahan alam. Formulasi juga dikembangkan untuk mengoptimalkan profil farmakokinetik. Proses akhir dari obat dari bahan alam adalah uji pre-klinis, klinis tahap I dan II. Setelah proses yang panjang ini, obat dari bahan alam akhirnya bisa dipasarkan (Syaifudin, 2014). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri yang berasosiasi dengan spons yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) yang merupakan proses uji aktivitas biologis sebagai awal penemuan senyawa untuk pembuatan obat.

MATERI DAN METODE

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah spons nomor RA-S20 yang diperoleh dari Kepulauan Raja Ampat, Papua koleksi milik Agus Trianto, S.T. M.Sc., Ph.D yang akan diujikan

aktivitas bakteri asosiasinya terhadap MRSA di Laboratorium *Tropical Marine Biotechnology*, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro pada Juli 2020 – April 2021. Metode yang dilakukan yaitu purifikasi bakteri, penapisan aktivitas antibakteri dengan metode agar plug dan identifikasi molekuler isolat bakteri.

Isolasi dan Purifikasi Bakteri Asosiasi Spons

Spons RA-S20 sebesar 1x1 cm dihaluskan dengan menggunakan mortal dan alu dan dilakukan pengenceran bertingkat 10^{-1} - 10^{-4} dengan air laut steril yang bertujuan untuk mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan. Hasil pengenceran diinokulasikan sebanyak 10 μ l dengan teknik *pour plate* pada media Zobell Marine Agar dan diinkubasi selama 1x24 jam (Madigan *et al.*, 2011). Selanjutnya, diidentifikasi morfologi secara makroskopik (Marzuki *et al.*, 2014). Purifikasi dilakukan dengan cara isolat bakteri diinokulasikan ke media Zobell Agar miring dengan metode *streak*, kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 1-2x24 jam.

Penapisan Aktivitas Uji Antibakteri

Penapisan aktivitas uji antibakteri dilakukan dengan metode *agar plug*. Isolat bakteri RA-S20.1, RA.S20.2, RA-S20.4 dan RA-S20.5 diinokulasikan dengan teknik *pour plate* pada media Zobell Marine Agar pada cawan petri yang berisi media Zobell Agar dan diinkubasi selama 1-2x24 jam. Setelah inkubasi, media Zobell Agar yang telah berisi isolat bakteri di cetak dengan ukuran diameter \pm 6 mm menggunakan *blue tip*. Cetakan tersebut diletakkan terbalik diatas media MHA yang telah berisi bakteri uji yaitu MRSA. Kemudian diamati pada 1x24 jam. Indikasi aktivitas antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening (Balouiri *et al.*, 2016). Perhitungan luas zona pada media MHA dilakukan untuk melihat aktivitas uji antibakteri. Zona bening diukur sebanyak tiga kali pengulangan dengan menggunakan *software* ImageJ dengan data yang diinput berupa foto. Zona bening dihitung dengan rumus : total luas zona = diameter zona yang terbentuk – diameter disk/plug dengan satuan sentimeter.

Identifikasi Molekuler Bakteri

Kultur bakteri seberat \pm 50 μ g dimasukkan dalam microtube yang berisi 100 μ l ddH₂O dan saponin 0,5% 1000 μ l (dalam PBS) dan diinkubasi selama overnight pada suhu 4°C. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Isolat murni bakteri ditumbuhkan dalam media agar selama 1-2 hari untuk digunakan dalam ekstraksi DNA. Natan ditambahkan dengan 1 mL PBS dan divortex hingga homogen. Proses ini dilakukan sebanyak 2-3 kali dengan tujuan menghilangkan residu saponin. Natan ditambahkan dengan 100 μ l ddH₂O dan Chelex 20% 50 μ l. Kemudian dipanaskan dalam heating block dengan suhu 95°C selama 5 menit. Sampel kembali dipanaskan lagi dengan suhu dan waktu yang sama (Trianto *et al.*, 2019).

Amplifikasi DNA dengan PCR menggunakan komposisi bahan yang dimasukkan dalam PCR *tube* 0,5 μ L dari primer 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') sebagai *forward* primer, 0,5 μ L dari primer 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') sebagai *reverse* primer, master mix (GoTaq Green Mix) 12 μ L, 11 μ L larutan ddH₂O dan 1 μ L DNA *template*. Tahapan dalam PCR yaitu denaturasi pada 95°C selama 3 menit, *annealing* pada suhu 56.1°C selama 1 menit, elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit dengan 30 siklus dengan *final extension* pada 72°C selama 7 menit (Trianto *et al.*, 2019).

Pengecekan kualitas produk PCR dilakukan menggunakan elektroforesis dengan larutan buffer TAE 1x. Setelah sampel dimasukkan, kemudian dielektroforesis pada tegangan 100 volt dan 400 ampere selama 30 menit. Agarose direndam ethidium bromide selama 15–20 menit. Gel hasil elektroforesis dapat dilihat dengan alat UV-Transilluminator untuk mengetahui pita DNA yang terbentuk.

Sekuensing DNA dilakukan dengan mengirim sampel yang telah di amplifikasi ke Genetika Science. Sekuens yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan basis data GenBank pada *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Hasil BLAST dibuat menjadi pohon filogenetik dengan menggunakan software MEGA X (Trianto *et al.*, 2019).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Morfologi Spons

Berdasarkan hasil identifikasi morfologi secara makroskopis, spons RAS20 termasuk dalam kelas Demospongiae. Tubuh spons RA-S20 berwarna kuning kehijauan (cerah) karena mengandung pigmen yang terdapat pada amoebosit. Bentuk tubuh spons RA-S20 tidak beraturan dengan ukuran diameter $\pm 2,5$ cm. Habitat Demospongiae umumnya di laut dalam maupun dangkal. Demospongiae merupakan kelas terbesar yang mencakup 90% dari seluruh jenis spons (Marzuki, 2018). Gambar sampel spons dapat dilihat pada Gambar 1.

Isolasi Bakteri Asosiasi Spons

Spons nomor RA-S20 menghasilkan 5 isolat dengan kode RA-S20.1, RA-S20.2, RA-S20.3, RA-S20.4 dan RA-S20.5. Isolat kode RA-S20.1 memiliki morfologi berwarna kuning dengan ukuran sedang memiliki bentuk *irregular*, marginnya *undulate* serta elevasinya *crateriform*. Isolat kode RA-S20.2 memiliki morfologi berwarna transparan dengan ukuran sedang, memiliki bentuk *irregular*, marginnya *undulate* serta elevasinya *raised*. Isolat kode RA-S20.3 memiliki morfologi berwarna transparan dengan ukuran sedang, memiliki bentuk *circular*, marginnya *entire* serta elevasinya *flat*. Isolat kode RA-S20.4 memiliki morfologi berwarna *cream* dengan ukuran kecil, memiliki bentuk *circular*, marginnya *entire* serta elevasinya *flat*. Sedangkan isolat kode RA-S20.5 memiliki morfologi berwarna putih pucat dengan ukuran *pin point*, memiliki bentuk *circular*, marginnya *entire* serta elevasinya *flat*. Penamaan kode isolat dan ciri morfologinya dapat dilihat pada Tabel 6.



Gambar 1. Spons RA-S20

Tabel 1. Hasil Identifikasi Morfologi Bakteri Asosiasi Spons

Isolat	Warna	Ukuran	Bentuk	Margin	Elevasi
RA-S20.1	Kuning	Sedang	<i>Irregular</i>	<i>Undulate</i>	<i>Crateriform</i>
RA-S20.2	Transparan	Sedang	<i>Irregular</i>	<i>Undulate</i>	<i>Raised</i>
RA-S20.3	Transparan	Sedang	<i>Circular</i>	<i>Undulate</i>	<i>Crateriform</i>
RA-S20.4	<i>Cream</i>	Kecil	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>
RA-S20.5	Putih Pucat	<i>Pin point</i>	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>

Penapisan Aktivitas Antibakteri

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada Tabel 6 didapatkan total 5 isolat bakteri, kemudian dilanjutkan dengan penapisan yang dilakukan untuk mengetahui potensi aktivitas antibakteri terhadap dua bakteri patogen uji yaitu MRSA. Isolat bakteri dengan kode RA-S20.4 dan RA-S20.5

memiliki zona hambat antara 6-10 mm terhadap MRSA dengan yang paling luas zona hambatnya pada isolat RA-S20.5. Hasil penapisan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Penapisan Aktivitas Antibakteri Terhadap Bakteri MRSA

No	Kode Isolat	Aktivitas
1	RA-S20.1	-
2	RA-S20.2	-
3	RA-S20.3	-
4	RA-S20.4	+
5	RA-S20.5	+

Keterangan: (+) ada aktivitas, (-) tidak ada aktivitas.

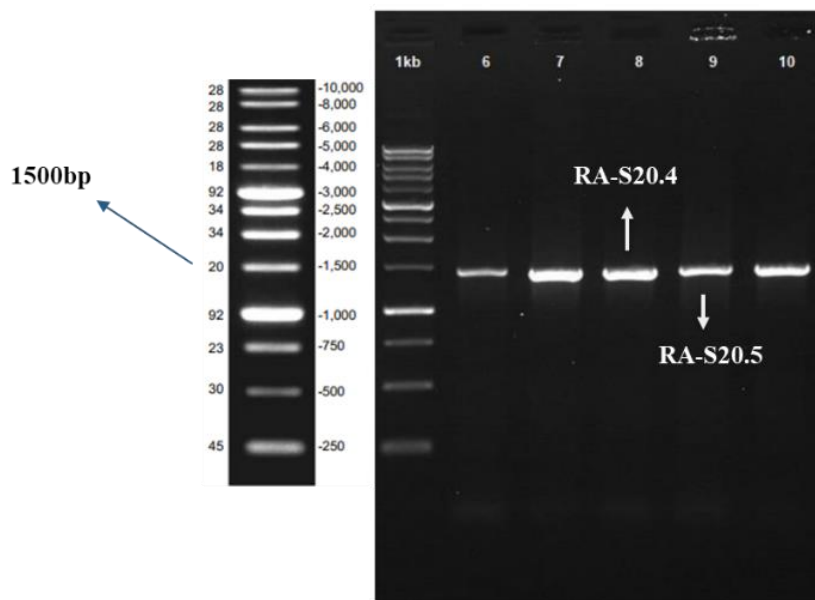
Tabel 3. Hasil Pengukuran Zona Hambat

No	Kode Isolat	Rata-Rata Zona Hambat (mm)
1	RA-S20.4	8,310 ± 0,051
2	RA-S20.5	9,569 ± 0,105

Keterangan: Hasil zona hambat sudah dikurangi diameter *plug* sebesar 6 mm.

Identifikasi Bakteri Secara Molekuler

Isolat potensial yang telah diamplifikasi menggunakan PCR ditandai dengan terbentuknya *band* tunggal dari masing-masing DNA bakteri. Hasil amplifikasi gen digunakan untuk identifikasi lebih lanjut. Hasil amplifikasi isolat RA-S20.4 dan RA-S20.5 menunjukkan adanya DNA bakteri asosiasi spons yang ditunjukkan dengan pita DNA diukur ±1500bp. Visualisasi pita DNA bakteri asosiasi spons dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 1. Visualisasi Pita DNA Isolat RA-S20.4 dan RA-S20.5

Identifikasi bakteri secara molekuler dilakukan untuk dua isolat aktif bakteri asosiasi spons dengan kode isolat RA-S20.4 dan RA-S20.5 yang mampu membentuk zona hambat pada penapisan aktivitas antibakteri. Berdasarkan hasil dari penelusuran BLAST Homologi pada Tabel

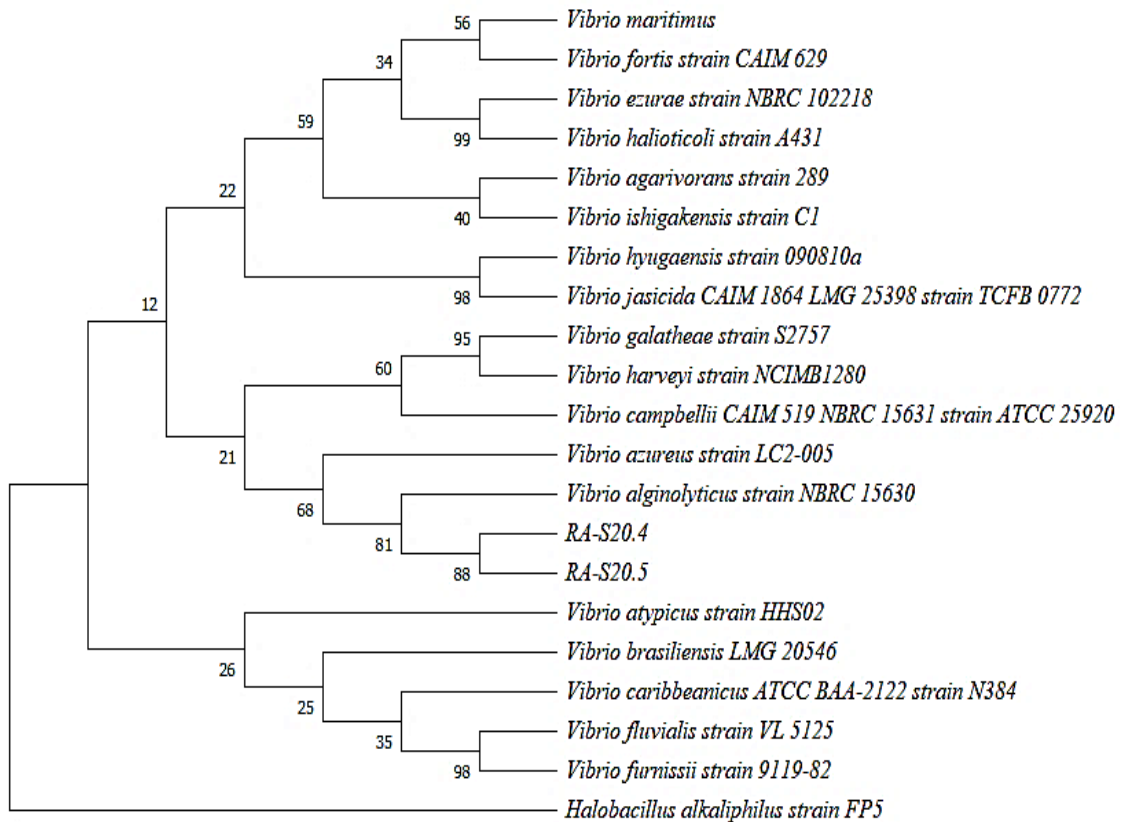
10, diketahui bahwa isolat RA-20.4 memiliki tingkat kekerabatan dekat dengan bakteri *Vibrio alginolyticus* dengan homologi (*present identify*) sebesar 99.86%. Isolat RA-20.5 memiliki tingkat kekerabatan dekat dengan bakteri *Vibrio alginolyticus* dengan homologi (*present identify*) sebesar 99,65%. Berikut hasil penelusuran homologi bakteri asosiasi spons dengan menggunakan sistem BLAST yang disajikan dalam Tabel 4.

Berdasarkan hasil analisis diatas, dapat dikatan baik karena presentase kemiripan sangat tinggi yaitu >97% dan nilai dari e value adalah 0. Nilai e value merupakan nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik yang signifikan terhadap kedua sekuen (Sandy *et al.*, 2015). Nilai e value yang semakin tinggi menunjukkan tingkat homologi antara kedua sekuen semakin rendah, sedangkan jika nilai e value semakin rendah maka maka tingkat homologi kedua sekuen semakin tinggi. Apabila nilai e value 0 (nol), hal ini menunjukkan bahwa kedua sekuen tersebut identik (Claverie dan Notredame, 2003).

Hasil pengolahan data pasangan basa (*base pair*) untuk pembuatan pohon filogenetik menunjukkan adanya pengelompokkan (*clustering*) isolat bakteri asosiasi spons dengan bakteri lain dalam tingkatan kekerabatan terdekat hingga terjauh. Tingkat kekerabatan pada isolat bakteri RA-S20.4 dan RA-S20.5 menunjukkan kekerabatan yang sangat dekat dengan *Vibrio alginolyticus* seperti yang terlihat pada Gambar 3.

Tabel 4. Hasil Penelusuran Homologi Menggunakan Sistem BLAST

No	Kode Isolat	Hasil Identifikasi	Query Cover	Persent Identify	E value	Acc Number
1	RA-S20.4	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99%	99.86%	0,01	NR_113781.1
2	RA-S20.5	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100%	99.65%	0,01	NR_113781.1



Gambar 2. Pohon Filogenetik Isolat Bakteri RA-S20.4 dan RA-S20.5

Tingkat kekerabatan pada isolat bakteri dengan kode RA-S20.4 dan RA-S20.5 menunjukkan kekerabatan yang sangat dekat dengan *Vibrio alginolyticus*. Outgrup dari hasil konstruksi pohon filogenetik adalah *Halobacillus alkaphilus* karena spesies ini tidak memiliki kekerabatan dengan isolat bakteri asosiasi spons.

Berdasarkan hasil identifikasi morfologi (Tabel 1), isolat RA-S20.4 dan RA-S20.5 yang diindikasikan sebagai *Vibrio alginolyticus* memiliki warna koloni cream (kuning agak kecoklatan), bagian tepi circular serta elevasinya flat sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Dahlia *et al.* (2017). Penelitian yang dilakukan oleh Nursyam (2017) juga menyebutkan bahwa *Vibrio alginolyticus* memiliki warna koloni cream (kuning agak kecoklatan) dan bagian tepinya circular. *V. alginolyticus* dilaporkan dapat berasosiasi dengan spons dan dapat memproduksi senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibakteri.

Bakteri *Vibrio alginolyticus* dilaporkan dapat berasosiasi dengan spons dan dapat memproduksi senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibakteri. Menurut penelitian Nursyam (2017) menyebutkan bahwa *V. alginolyticus* dapat hidup berasosiasi dengan spons *Haliclona* sp. yang didapatkan dari Pulau Gili, Probolinggo. Selain itu, penelitian yang telah dilakukan oleh Trianto *et al.* (2019) juga menyebutkan bahwa bakteri *Vibrio alginolyticus* merupakan salah satu bakteri simbiosis hasil eksplorasi dari spons yang berasal dari Kepulauan Ternate dan bakteri tersebut memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen MRSA (*Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*). Pernyataan tersebut mendukung hasil penelitian ini bahwa isolat RA-S20.4 dan RA-S20.5 merupakan bakteri asosiasi hasil eksplorasi dari spons dan dapat memproduksi senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen MRSA (*Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*).

Vibrio alginolyticus memiliki distribusi geografis yang besar di perairan laut dan estuaria. Sebagian besar bakteri fluorescent memiliki sifat halophilic (Nursyam, 2017). *V. alginolyticus* dapat tumbuh optimal pada 20-40‰ salinitas air laut. Bakteri tersebut dianggap spesies yang paling sering hidup bebas dalam air dan sedimen (Harriague *et al.*, 2008) dan dapat bertahan hidup di air laut bahkan dalam kondisi stress dan kekurangan nutrisi sembari mempertahankan virulensi (Kahla-Nakbi *et al.*, 2007). Anggota genus *Vibrio* berbahaya karena menjadi penyebab vibriosis pada kerapu (Nitimulyo *et al.*, 2005). Menurut Murdjani (2002), salah satu jenis *Vibrio* yang umum berkaitan dengan terjadinya penyakit pada kerapu tikus, kakap putih dan kakap merah adalah *Vibrio alginolyticus*. Selain sebagai bakteri asosiasi pada spons, *Vibrio alginolyticus* merupakan jenis yang paling patogen terhadap kerapu tikus yang menyebabkan kematian sampai 100% dengan nilai LD50 106,65 sel/ikan. Serangan *Vibrio alginolyticus* pada kerapu tikus menyebabkan gejala penyakit berupa mulut merah, tubuh berbercak merah, pembengkakan rongga perut (akibat pembengkakan organ dalam dan akumulasi cairan sisa metabolisme), serta putus sirip (Taslihan *et al.* 2000).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil identifikasi morfologi secara makroskopis, spons RA-S20 berbentuk tidak beraturan berwarna kuning kehijauan termasuk dalam kelas Demospongiae. Bakteri asosiasi spons RA-S20 menghasilkan 5 isolat dengan kode RA-S20.1, RA-S20.2, RA-S20.3, RA-S20.4 dan RA-S20.5. Terdapat dua isolat yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap MRSA, perhitungan zona hambat isolat RA-S20.4 sebesar 8,3 mm dan isolat RA-S20.5 sebesar 9,6 mm dikategorikan memiliki daya hambat sedang karena berkisar antara 6-10 mm. Berdasarkan hasil identifikasi bakteri secara molekuler menunjukkan bahwa isolat RA-S20.4 dan RA-S20.5 memiliki kekerabatan dekat dengan *Vibrio alginolyticus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Claverie, J. M., & Notredame, C., 2003. *Bioinformatics for Dummies*. Indianapolis: Wiley Publishing.
- Dahlia, H. Suprpto., & Kusdarwati, R., 2017. *Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Pada Benih Ikan*

- Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) Dari Kolam Pendederan Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo, Jawa Timur, Situbondo, East Java. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 6(2):57-66. DOI: 10.20473/jafh.v6i2.11280
- Harriague, A.C., Di Brino, M., Zampini, M., Albertelli, G., Pruzzo, C., & Misic, C., 2008. Vibrios in association with sedimentary crustaceans in three beaches of the northern Adriatic Sea (Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 56: 574-579. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2007.12.011
- Kahla-Nakbi, A.B., Besbes, A., Chaieb, K., Rouabhia, M. & Bakhrouf, A., 2007. Survival of *Vibrio alginolyticus* in seawater and retention of virulence of its starved cells. *Marine Environmental Research*, 46: 469-478. DOI: 10.1016/j.marenvres.2007.04.002
- Madigan, M. T., David, P., Clarck, D. S., John, M., & M. Martinko. 2011. *Brack Microbiology of Microorganism*. San Fransisco : Benjamin Cummings Publishing.
- Marzuki, I. 2018. Eksplorasi Spons Indonesia: Seputar Kepulauan Spermonde. Penerbit Nas Media Pustaka: Makassar. DOI: 10.31219/osf.io/vp369
- Marzuki, Noor, I. A., Nafie, N.L., & Djide, M., 2014. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Symbion Spons Penghasil Enzim Amilase Asal Pantai Melawai Balikpapan. *Jurnal Ilmiah "dr. Aloe Saboe"*, 2(2):11-18.
- Molinski, T.F., Dalisay, D.S., Lievens, S.L. & Saludes, J.P., 2009. Drug development from marine natural products. *Nature reviews Drug discovery*, 8(1):69-85. DOI: 10.1038/nrd2487
- Murdjani, M. 2002. Identifikasi dan patologi bakteri *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). Ringkasan Disertasi. Universitas Brawijaya. Malang: 48
- Negara, K.S. 2014. Analisis Implementasi Kebijakan Penggunaan Antibiotika Rasional Mencegah Resistensi Antibiotika di RSUP Sanglah Denpasar : Studi Infeksi *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus*. *Jurnal ARSI*, 1(1):42-50.
- Nitimulyo, K.H., Isnansetyo, A., Triyanto, T., Istiqomah, I. & Murdjani, M., 2005. Patogen Penyebab Vibriosis Pada Kerapu Di Balai Budidaya Air Payau Situbondo. *Jurnal Perikanan, Universitas Gadjah Mada*, 7(2):80-94. DOI: 10.22146/jfs.9053
- Nursyam, H. 2017. Antibacterial activity of metabolites products of *Vibrio alginolyticus* isolated from sponge *Haliclona* sp. Against *Staphylococcus aureus*. *Italian Journal of Food Safety*, 6(1) :18–22. DOI: 10.4081/ijfs.2017.6237
- Nuryah, A., Yuniarti, N., & Puspitasari, I., 2019. Prevalensi Dan Evaluasi Kesesuaian Penggunaan Antibiotik Pada Pasien Dengan Infeksi Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Di RSUP Dr. Soeradji Tirtonegoro Klaten. *Majalah Farmaseutik*, 15(2):123-129. DOI: 10.22146/farmaseutik.v15i2.47911
- Samirudin, Anwarrudin, S., Layn, A.A., & Yanti, N.A., 2018. Screening Bakteri Yang Bersimbiosis Dengan Spons Jenis *Petrosia* sp. Sebagai Penghasil Antibakteri dari Perairan Taman Nasional Wakatobi. *Biowallacea*, 5(1):708-715.
- Sandy, Y. A., Djauhari, S., & Sektiono, A.W. 2015. Identifikasi Molekuler Jamur Antagonis *Trichoderma harzianum* Diisolasi dari Tanah Pertanian di Malang, Jawa Timur. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan*, 3(3):1–8.
- Sugireng., & Lio, T. M. P., 2020. Penapisan Bakteri Penghasil Senyawa Metabolit Anti- Mrsa Yang Bersimbiosis Dengan *Holothuria Scabra* Asal Perairan Tanjung Tiram. *Jurnal Biologi Makassar*, 5(1):34–39.
- Syaifudin, A. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder*. Deepublish : Yogyakarta.
- Taslihan, A., Murdjani, M., Purbomartono, C. & Kusnendar, E., 2000. Bakteri patogen penyebab penyakit mulut merah pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). *Jurnal Perikanan*, 2(2): 57-62.
- Taylor, M.W., Radax, R., Steger, D. & Wagner, M., 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(2):295-347. DOI: 10.1128/MMBR.00040-06
- Trianto, A., Radjasa, O.K., Sabdono, A., Muchlissin, S.I., Afriyanto, R., Sulistiowati, S., Radjasa, S.K., Crews, P. & Mccauley, E., 2019. Exploration culturable bacterial symbionts of sponges from Ternate Islands, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 20(3):776-782. DOI: 10.13057/biodiv/d200323

- Wewengkang, D.S., Sumilat, D.A. & Rotinsulu, H. 2014. Karakterisasi Dan Bioaktif Antibakteri Senyawa Spons *Haliclona* Sp. Dari Teluk Manado. *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi.*, 1(1):71-86.
- Wibowo, J. T. 2014. Perkembangan Penemuan Bahan Baku Obat Dari Sumber Daya Hayati Laut. *Oseana.*, 39(3):41–49.