

Ni Nengah Suriadnyani

By Diah Ayu Satyari Utami

PENINGKATAN PERTUMBUHAN MIKROALGA *Chaetoceros ceratosporum* DAN *Nannochloropsis oculata* MENGGUNAKAN STRAIN BAKTERI TERSELEKSI PADA KULTUR SKALA TERKONTROL

ABSTRAK

Sejalan dengan peningkatan produksi budidaya perikanan, maka diperlukan intensifikasi produksi benih ikan atau udang. Di antara permasalahan yang dihadapi pembenih adalah ketersediaan pakan alami (*microalgae*) yang memadai dan kontinu baik kualitas maupun kuantitas selama pemeliharaan larva. Upaya meningkatkan produksi mikroalga melalui pendekatan hubungan koeksistensi dan pemacuan pertumbuhan dengan memanfaatkan peran bakteri yang menguntungkan perlu dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan dan mengetahui efektivitas *strain* bakteri terseleksi yang mempunyai kemampuan menstimulasi pertumbuhan dalam meningkatkan pertumbuhan mikroalga pada kultur skala terkontrol. Pada penelitian ini digunakan mikroalga *Chaetoceros ceratosporum* dan *Nannochloropsis oculata*. Bakteri yang berasosiasi dalam kultur tersebut diisolasi, dilakukan *screening*, uji aktivitas sintesis enzimatis, karakterisasi, identifikasi, kultur, dan re-inokulasi pada kultur mikroalga. Hasil yang diperoleh ada tujuh isolat bakteri dari *C. ceratosporum* dan delapan isolat dari *N. oculata*. Hasil uji aktivitas sintesis enzimatis ternyata hanya ada satu *strain* (kode CC-22) pada *C. ceratosporum* dan dua *strain* pada *N. oculata* (kode NN-5 dan NN-6) yang potensial menunjukkan peran stimulasi pertumbuhan mikroalga. Dengan pendekatan karakterisasi molekuler menggunakan 16SrRNA maka diperoleh *Marinobacter vinifirmus* CC22, *Alteromonas* sp. NN-5, dan *Marinobacter hydrocarbonoclastic* NN-6. Dari tiga *strain* bakteri yang terisolasi nampaknya hanya *Marinobacter vinifirmus* CC22 dan *Alteromonas* sp. NN-5 yang mempunyai sifat dapat memacu pertumbuhan *C. ceratosporum* sebesar 1,76 kali (176 %) dan *N. oculata* sebesar 1,56 kali (156 %) dibandingkan dengan kontrol. Kedua *strain* bakteri ini menunjukkan potensi untuk meningkatkan kuantitas dan kualitas mikroalga serta berpeluang sebagai *probiotic agent* untuk menstimulasi pertumbuhan *C. ceratosporum* dan *N. oculata*.

KATA KUNCI: *Chaetoceros ceratosporum*; mikroalga; *Nannochloropsis oculata*; pertumbuhan; *strain* bakteri

ABSTRACT: *Growth Enhancement of Microalgae Chaetoceros ceratosporum and Nannochloropsis oculata Using Selected Bacterial Strains in Controlled Scale Cultures*

*In line with the increase in aquaculture production, it is necessary to intensify the production of fish or shrimp seeds. Among the problems faced by hatcheries is the availability of adequate and continuous live feed (microalgae) both in quality and quantity during larval rearing. Efforts to increase microalgae production through a coexistence relationship approach and promoting growth by utilizing the role of beneficial bacteria need to be carried out. The aims of this study were to obtain and determine the effectiveness of selected bacterial strains that had the ability to stimulate growth in increasing microalgae growth in controlled scale cultures. In this study, the microalgae *Chaetoceros ceratosporum* and *Nannochloropsis oculata* were used. Bacteria associated in the culture were isolated, screened, tested for enzymatic synthesis activity, characterization, identification, culture, and re-inoculation on microalgal cultures. The results obtained were seven bacterial isolates from *C. ceratosporum* and eight isolates from *N. oculata*. The results of the enzymatic synthesis activity test showed that there was only one strain (code CC-22) in *C. ceratosporum* and two strains in *N. oculata* (codes NN-5 and NN-6) which potentially showed a role in stimulating microalgae growth. With a molecular*

characterization approach using 16SrRNA, *Marinobacter vinifirmus* CC22, *Alteromonas* sp. NN-5, and *Marinobacter hydrocarbonoclastic* NN-6. From the three isolated bacterial strains, it appeared that only *Marinobacter vinifirmus* CC22 and *Alteromonas* sp. NN-5 had the property of being able to stimulate the growth of *C. ceratosporum* by 1.76 times (176%) and *N. oculata* by 1.56 times (156%) compared to the control. These two bacterial strains showed the potential to increase the quantity and quality of microalgae and had the opportunity to act as probiotic agents to stimulate the growth of *C. ceratosporum* and *N. oculata*.

KEYWORDS: *bacterial strain; Chaetoceros ceratosporum; growth; microalgae; Nannochloropsis oculata*

PENDAHULUAN

1 Mikroalga merupakan sumberdaya alam terbesar dan terperbarui untuk penyediaan komponen bernilai tinggi bagi kepentingan budidaya perikanan (akuakultur), peternakan, kesehatan, farmasi, dan minyak-gas. Dewasa ini, akuakultur merupakan salah satu industri yang berkembang pesat di dunia. Sejalan dengan peningkatan produksi budidaya perikanan di Indonesia, maka diperlukan intensifikasi produksi benih ikan atau udang. Permasalahan utama yang dihadapi dalam produksi benih adalah rendahnya sintasan pada saat pemeliharaan larva ikan atau udang. Hal ini sangat berhubungan dengan beberapa faktor, di antaranya kualitas telur, lingkungan pemeliharaan (mutu air dan mutu pakan buatan), infeksi penyakit, dan ketersediaan pakan alami yang memadai dan kontinu baik kualitas maupun kuantitas selama pemeliharaan larva. Hal ini mengingatkan bahwa mikroalga merupakan pakan alami awal bagi larva. Pada 4 umumnya mikroalga bersifat uniseluler, fototrof, dan berkembang biak di air tawar atau air laut. Hampir semua mikroorganisme fotosintetik tersebut menunjukkan peran sebagai sumberdaya biologis yang eksklusif dan berperan sangat luas untuk aplikasi akuakultur.

Upaya peningkatan produksi mikroalga melalui pendekatan hubungan koeksistensi dan pemacuan pertumbuhan dengan memanfaatkan peran bakteri yang menguntungkan perlu dilakukan. Peran bakteri dalam media pemeliharaan mikroalga dapat berfungsi sebagai pendekomposisi bahan organik dan memanfaatkan bahan organik terlarut, mengekresi senyawa nutrisi esensial yang bermanfaat bagi pertumbuhan mikroalga, memberikan keseimbangan kondisi mikroorganisme dalam media kultur, memproduksi substansi penghambat

pertumbuhan bakteri patogen, dan berperan dalam kompetisi dengan mikroba lain yang merugikan (Cooper & Smith, 2015; Sureshkumar, *et al.*, 2014; Torres-Maravilla, 2024). Di samping itu Saccardo *et al.* (2022) dan Ma *et al.* (2020) menyatakan bahwa mikroalga pada akuakultur memberikan peran sebagai peneduh (*light shading*) pada media kultur larva, sumber pakan alami langsung, mengkondisikan mutu air, mengkondisikan pakan alami lainnya, mensuplai mikronutrien, dan sebagai immunostimulan serta kontrol mikroba.

Berbagai penelitian dan pengembangan produksi mikroalga untuk penyediaan pakan alami dalam produksi benih ikan dan udang telah dilakukan, meliputi teknik kultur dalam berbagai skala produksi, optimasi kondisi lingkungan kultur, optimasi kepadatan awal kultur, dan optimasi nutrisi (Sofiyah *et al.* 2021; Tan *et al.*, 2020). Selain itu, di antara stimulasi yang pernah dilakukan adalah penyinaran dengan intensitas cahaya tinggi (Farahin *et al.*, 2021; Metsoviti *et al.*, 2019; Prasetyo, 2022), penyinaran UV dengan waktu eksposur singkat, penggunaan CO₂ (Cardias, 2023) serta penggunaan NaCl dan Fe²⁺ (Polat *et al.*, 2020).

Namun demikian, kultur mikroalga seringkali masih mengalami kegagalan, di antaranya jumlah kepadatan sel yang rendah, umur kultur yang pendek sehingga dengan cepat mikroalga mengalami kematian, dan kualitas sel yang rendah (kandungan nutrisi, pigmentasi, dinding sel keropos, dan sel mengalami penggumpalan). Studi penggunaan bakteri untuk pemacuan pertumbuhan mikroalga belum banyak dilakukan di Indonesia, sementara biodiversitas bakteri sangat kaya untuk diungkap perannya sebagai bakteri yang menguntungkan dalam kultur mikroalga. Dengan demikian nampaknya penggunaan bakteri dapat dijadikan alternatif dalam memperbaiki teknik kultur mikroalga, terutama dalam meningkatkan pertumbuhan dan produktivitas mikroalga.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan dan mengetahui efektivitas *strain* bakteri terseleksi yang mempunyai kemampuan menstimulasi pertumbuhan dalam meningkatkan pertumbuhan mikroalga pada kultur skala terkontrol, sehingga diperoleh kualitas dan kuantitas

sel dan produktivitas mikroalga yang baik. Ke depan diharapkan penelitian ini dapat menjadi sumber pengetahuan untuk meningkatkan produksi mikroalga melalui penggunaan *strain* bakteri sebagai agen probiotik.

BAHAN DAN METODE

Penyediaan Mikroalga Uji melalui Kultur pada *Agar Plate*

Mikroalga *Chaetoceros ceratosporum* dan *Nannochloropsis oculata* yang digunakan sebagai mikroalga uji merupakan biakan hasil kultur murni di Laboratorium Kawasan Konservasi Ilmiah Biota Laut-Gondol, Badan Riset dan Inovasi Nasional. Biakan mikroalga dikultur dalam media agar (Nacalai Tesque, Cat No. 01028-85) dengan konsentrasi 1,5% dan penambahan pupuk seperti tertera pada Tabel 1. Penyiapan media agar dilakukan dengan metoda *steaming*. Larutan agar dalam *flash glass* direndamkan dalam air mendidih (dalam panci) dan selalu dikocok hingga larutan agar yang keruh menjadi bening. Hal ini untuk menghindari terdegradasinya unsur hara dalam larutan media tumbuh. Biakan mikroalga yang tumbuh di media agar, selanjutnya dibiakkan lagi dalam media cair. Pengambilan biakan mikroalga dilakukan dengan jarum ose dan dimasukkan ke dalam *test tube* berisi media tumbuh cair volume 10 mL. Kultur selanjutnya diperbesar hingga mencapai volume yang dikehendaki.

Biakan mikroalga selanjutnya diinkubasi atau dikultur dalam ruangan dengan intensitas cahaya berkisar 2.000-2.500 lux, suhu 23-24°C selama 7 hari. Secara bertingkat biakan mikroalga dari volume 10 mL (*test tube*) diperbesar hingga volume 100 mL. Pada kultur ini tidak dilengkapi dengan aerasi, namun hanya melalui pengocokan setiap hari (pagi dan sore). Apabila kultur mikroalga sudah tumbuh, maka biakan ini dijadikan inokulan pada kultur volume 1.000 mL. Pada kultur ini dilengkapi aerasi yang telah melalui filtrasi dengan ukuran 0,45 μm . Mikroalga yang digunakan adalah *C. ceratosporum* (diatom) dan *N. oculata*

(nondiatom). Wadah yang digunakan dalam penelitian ini adalah *flash glass* volume 1 L masing-masing dengan tiga ulangan.

Tabel 1. Komposisi nutrisi untuk kultur mikroalga *Chaetoceros ceratosporum* dan *Nannochloropsis oculata* pada volume skala terkontrol (1000 mL)

Table 1. Nutrient composition for *Chaetoceros ceratosporum* and *Nannochloropsis oculata* microalgae culture at controlled scale volume (1000 mL)

Bahan kimia <i>Chemicals</i>	Konsentrasi <i>Concentration</i>	<i>Chaetoceros ceratosporum</i>	<i>Nannochloropsis oculata</i>
NaNO ₃	100 g L ⁻¹	3 mL	
Na ₂ HPO ₄	14 g L ⁻¹	1 mL	
Na ₂ SiO ₃	5 g L ⁻¹	1 mL	
Clewat-32	100 g L ⁻¹	1 mL	3 mL
Vitamin mix (Thiamin: 1 g L ⁻¹ ; Vitamin B12: 0,2 g L ⁻¹ ; Vitamin H: 0,2 g L ⁻¹)		1 mL	1 mL
Larutan-A: KNO ₃	202 g L ⁻¹		2 mL
Larutan-B: HCl: Na ₂ HPO ₄ : 50 g L ⁻¹ ; CaCl ₂ H ₂ O: 33,5 g L ⁻¹	14 mL L ⁻¹		1 mL
B-solution: HCl: Na ₂ HPO ₄ : 50 g L ⁻¹ ; CaCl ₂ H ₂ O: 33,5 g L ⁻¹			

Koleksi Isolat Bakteri

Isolat bakteri dikoleksi dari sumber media kultur mikroalga diatom (*C. ceratosporum*), dan nondiatom (*N. oculata*) baik skala kecil atau massal, kemudian ditumbuhkan pada *petridish* yang berisi *marine agar* 2216 E (Difco, Cat No. 8079517). Sampel air media kultur disebar pada *petridish*. Selanjutnya bakteri akan tumbuh setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 25°C. Setiap *petridish* dipilih 3-5 koloni berdasarkan bentuk, warna, dan ukuran, selanjutnya dipurifikasi tiga kali, hingga diperoleh koloni tunggal yang murni. Biakan *strain* bakteri ini selanjutnya disimpan dalam *marine agar* miring untuk uji selanjutnya. Di samping itu juga dilakukan pengkulturan dalam media TCBS (*thiosulphate citrate bile salts*) agar bagi semua isolat hasil isolasi. Media TCBS agar merupakan media yang spesifik untuk pertumbuhan *strain Vibrio*. Dalam penelitian ini *strain* bakteri dari kelompok *Vibrio* tidak dipilih sebagai kandidat *strain* bakteri pemacu pertumbuhan mikroalga.

Karakterisasi dan Identifikasi Isolat Bakteri

Kandidat probiotik dari isolat bakteri yang mempunyai potensi kemampuan pemacu pertumbuhan mikroalga diuji sifat biologis dan fisiologisnya untuk mengetahui karakteristik dari bakteri tersebut. Langkah awal dalam karakterisasi dan identifikasi dilakukan *screening* terhadap isolat bakteri hasil purifikasi dengan isolasi DNA, menggunakan Presto Mini gDNA Bakteria Kit (Genaid, Cat No. GBB100). Ekstraksi DNA mengikuti protokol yang tersedia dari kit tersebut. Genom DNA hasil ekstraksi selanjutnya diamplifikasi PCR menggunakan metode RAPD (*random amplification polymorphism DNA*) *fingerprint* untuk mengetahui performansi fragmentasi DNA. Analisis *fingerprint* menggunakan universal primer 2 AAM2 (5'-CTG CGA CCC AGA GCG G -3') dalam *speedy cycle* PCR. Amplikon yang diperoleh difragmentasi dengan *agarose gel* 1,8 % dalam 1 x TBE. Hasil fragmentasi DNA didokumentasikan dengan *gel doc* (Vilber-Quantum). Dalam *screening* ini, isolat bakteri yang mempunyai susunan *fragment* DNA yang sama hanya dipilih satu *strain* saja, sehingga hanya isolat bakteri yang mempunyai profil fragmentasi berbeda antarisolat yang akan digunakan untuk uji selanjutnya.

Langkah selanjutnya adalah mengamplifikasi genom DNA hasil *screening* yang terpilih dengan PCR menggunakan pasangan primer 27F (5' AGAGTTTGA TCC TGG CTC AG-3') dan 1492 R (5'-ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT-3') (Haryanti, 2002). Amplikon DNA yang diperoleh selanjutnya difragmentasi dengan *agarose gel* 1,5 % dalam 1 x TBE *buffer*. Hasil fragmentasi DNA didokumentasikan dengan *gel doc* (Ultraviolet Vilber-Quantum CX5).

Identifikasi pada tingkat molekuler (DNA) dilakukan dengan *sequencing* susunan nukleotida DNA mengikuti metode Sambrook *et al.* (1989). Amplikon DNA yang diperoleh selanjutnya diidentifikasi dengan metoda *Sanger Sequencing*. *Sequencing* dilakukan dengan menggunakan jasa perusahaan komersial. Hasil *sequencing* selanjutnya dilakukan BLAST-N dalam NCBI GenBank.

Aktivitas Enzimatik dari Produk Ekstraseluler *Strain* Bakteri

Uji aktivitas enzimatis meliputi lipase, gelatinase, amilase, urease, casease, lecitinase, dan kitinase dilakukan terhadap isolat bakteri kandidat probiotik untuk mikroalga yang sudah terseleksi. Isolat bakteri diuji aktivitas enzimatisnya melalui ECP (*extra cellular product*) dengan metode pelat chelofan. Chelofan steril diletakkan di atas permukaan *marine 2216E agar* dalam *petridish* dan diinokulasikan biakan bakteri (*spreading*) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 25°C. ECP yang ada di permukaan selofan dicuci dengan larutan *buffer* PBS, pH 7,0. Suspensi disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 13.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh disaring secara steril dengan membran *filter* 0,22 µm (Dismic Filter).

Aktivitas enzim gelatinase, casease, amilase, lecitinase, lipase, urease, dan kitinase diuji dengan tabung silinder kecil yang diletakkan pada permukaan *plate agar*. Media agar 2% yang masing-masing mengandung 0.4% gelatin, 0,4% casein, 0,2% *starch*, 2.5 % *egg yolk*, 1% Tween 80, 2% urea, dan 2% *phenol red* disiapkan untuk menguji adanya aktivitas enzimatis tersebut. Pengujian dilakukan dengan meletakkan tabung silinder di atas masing-masing agar, diisi dengan 200 µL filtrat ECP. Dengan indikator adanya gambaran zona jernih pada sekitar tabung silinder, maka dapat diketahui aktivitas enzimatis produk kandidat probiotik dari isolat bakteri tersebut. Semakin luas gambaran zona jernih, semakin aktif daya hidrolisis enzim pada substrat agar dengan masing-masing kandungan nutrisi.

Kultur *Strain* Bakteri Terseleksi

Strain bakteri terpilih yang positif menunjukkan kemampuan peran sebagai pemacu pertumbuhan mikroalga, dikultur dengan *nutrient marine broth-2216* (Difco, Cat No. 9142906) hingga mencapai kepadatan 10^{9-10} CFU mL⁻¹. Metode pengkulturan bakteri mengikuti metode Nogami & Maeda (1992). Bila bakteri bersifat aerob diperlukan aerasi untuk memacu pertumbuhannya. Media kultur bakteri harus disterilkan dengan sterilisasi basah (*autoclave*)

pada suhu 121°C selama 15 menit. Kultur bakteri menggunakan wadah *flask glass* volume 300 mL diulang dua kali. Wadah kultur dilengkapi aerasi dengan Dismic Fiter *size pore* 0,22 µm untuk mencegah kontaminasi bakteri dari udara. Lama kultur 96 jam dengan interval waktu pengamatan setiap 24 jam. Penghitungan kerapatan sel bakteri menggunakan spektrofotometer dengan OD (*optical density*) 620 nm.

Penggunaan *Strain* Bakteri Terpilih untuk Pertumbuhan Mikroalga Skala Terkontrol

Biakan bakteri terpilih yang mempunyai kemampuan untuk memacu pertumbuhan mikroalga digunakan dalam media kultur mikroalga dengan kepadatan 10^4 CFU mL⁻¹. Selama aplikasi bakteri, air media kultur ditambahkan nutrient makro dan mikro sesuai metode yang ada (Haryanti, 2002). Hal ini untuk memaksimalkan pertumbuhan mikroalga dan kerja stimulasi bakteri. Pengujian dilakukan pada kultur *C. ceratosporum* dan *N. oculata*. Inokulasi bakteri diberikan pada awal pengkulturan mikroalga (*lag fase*) dan kepadatan sel mikroalga diamati setiap 2 hari sekali.

Analisis Data

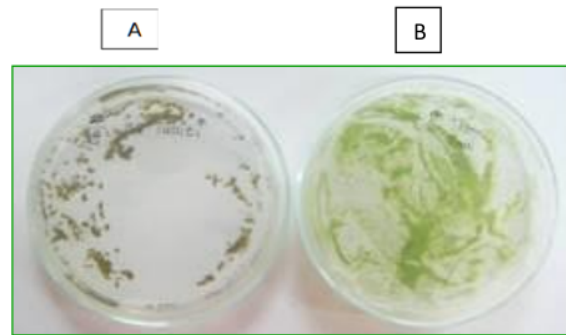
Data hasil penelitian meliputi kepadatan mikroalga, kepadatan bakteri spesifik, uji aktivitas enzimatis, disajikan dalam bentuk grafik dan dalam bentuk tabel. Adanya perbedaan dibahas secara deskriptif.

HASIL DAN BAHASAN

Kultur Mikroalga dalam Media Agar

Hasil pengkulturan *C. ceratosporum* dan *N. oculata* dalam media agar (Gambar 1A dan B) menunjukkan pertumbuhan yang baik tanpa ada kontaminasi bakteri pada media kultur. Hal ini dapat dipahami bahwa kandungan agar yang digunakan sebagai media tumbuh terdiri dari

sulfat (SO₄), Fe, kalsium (Ca) masing-masing sebesar 1,5%, 0,015%, dan 1,0%, tanpa ada kandungan protein, lipid atau karbohidrat dan ditambahkan makro dan mikronutrien sebagai pupuk untuk tumbuhnya mikroalga, sehingga bakteri tidak dapat tumbuh.



Gambar 1. Biakan mikroalga. (A) *Chaetoceros ceratosporum* dan (B) *Nannochloropsis oculata* pada media agar dalam petri-dish

Figure 1. Microalgae culture. (A) *Chaetoceros ceratosporum* and (B) *Nannochloropsis oculata* on agar media in petri-dishes

Isolat Bakteri dari Kultur Mikroalga

Isolat bakteri diambil dari media biakan kultur *C. ceratosporum* dan *N. oculata* skala kecil (1 m³). Kepadatan sel mikroalga, sel bakteri, dan performa koloni yang diperoleh tertera pada Tabel 1. Sementara itu, pengambilan sampel bakteri pada wadah kultur *C. ceratosporum* dan *N. oculata* skala besar (5 m³) tersaji dalam Tabel 2. Dari isolat bakteri yang ada, selanjutnya diseleksi berdasarkan pada ukuran koloni, warna, dan bentuk yang berbeda. Hasil seleksi tersebut diperoleh 23 isolat bakteri yang berasal dari media kultur *N. oculata* dan 14 isolat bakteri dari media kultur *C. ceratosporum*. Secara keseluruhan diperoleh 37 isolat bakteri yang telah dipurifikasi.

Tabel 2. Kepadatan sel mikroalga, bakteri, dan performa koloni pada kultur skala kecil (1 m³) *Chaetoceros ceratosporum* dan *Nannochloropsis oculata*

Table 2. The density of microalgae, bacteria, and performance of cells colony on small scale culture (1 m³) of *Chaetoceros ceratosporum* and *Nannochloropsis oculata*

Jenis mikroalga <i>Species of microalgae</i>	Kepadatan sel mikroalga (x 10 ⁴ sel mL ⁻¹) <i>Cells density of microalgae (x10⁴ cells mL⁻¹)</i>	Kepadatan sel bakteri (x 10 ² CFU mL ⁻¹) <i>Cells density of bacteria (x 10² CFU mL⁻¹)</i>	Keterangan <i>Remarks</i>
<i>Chaetoceros ceratosporum</i>	1330	61	koloni bening kecil <i>Small clear colony</i>
<i>Nannochloropsis oculata</i>	2275	84	koloni putih kecil <i>White small colony</i>
		6	Koloni putih besar <i>White big colony</i>

Pada Tabel 2 terlihat bahwa kepadatan sel mikroalga, *C. ceratosporum* dan *N. oculata* pada wadah 1 m³ sangat tinggi dan diikuti dengan adanya populasi bakteri dengan ukuran dan performa yang berbeda (koloni besar dan kecil), masing-masing dengan kepadatan antara 61 x 10² CFU mL⁻¹ dan 6-84 x 10⁴ CFU mL⁻¹. Hal ini jelas menunjukkan bahwa ada korelasi yang nyata dari koeksistensi bakteri dalam membantu pertumbuhan mikroalga.

Hal yang berbeda dengan kultur massal mikroalga yang terlihat pada Tabel 3. Nampak bahwa kepadatan bakteri pada kultur massal mikroalga (*N. oculata*) sangat rendah (6 x 10² hingga 2,7 x 10³ CFU mL⁻¹). Di samping itu pada kultur massal tersebut banyak dijumpai performansi bakteri yang tumbuh melayang dalam *marine 2216E agar*. Karakter koloni melayang ini banyak mengindikasikan dari kelompok bakteri *Vibrio* sp. Sementara pada kultur massal *C. ceratosporum*, populasi bakteri berkisar 9-30 x 10² CFU mL⁻¹, namun tidak diperoleh bakteri melayang dalam populasinya.

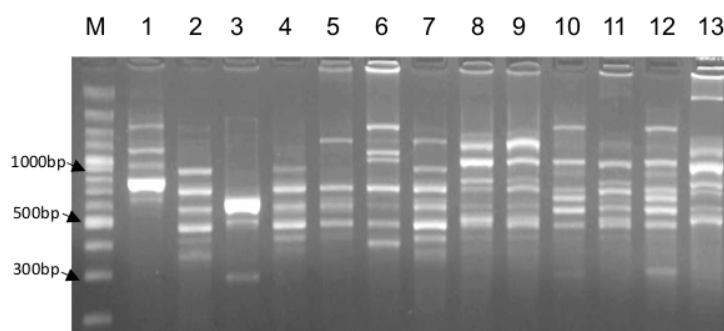
Tabel 3. Kepadatan sel mikroalga, bakteri, dan performa koloni pada media kultur skala besar
Chaetoceros ceratosporum dan *Nannochloropsis oculata*
Table 3. Density of microalgae, bacteria, and performance of cells colony on big scale culture
of *Chaetoceros ceratosporum* and *Nannochloropsis oculata*

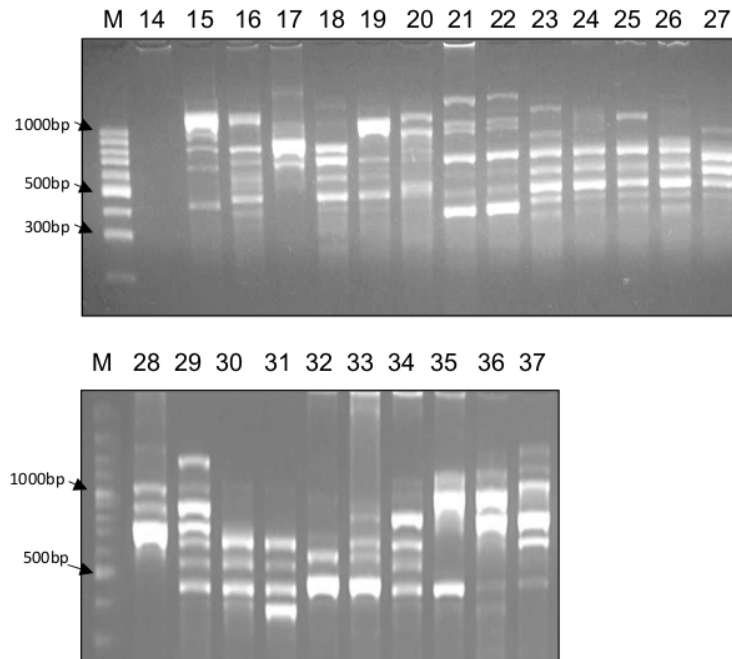
Kode bak <i>Tank codes</i>	Kepadatan sel mikroalga (x10 ⁴ sel mL ⁻¹) <i>Cells density of microalgae (x10⁴ cells mL⁻¹)</i>	Kepadatan bakteri (x 10 ² CFU mL ⁻¹) <i>The cell density of bacteria (x 10² CFU mL⁻¹)</i>	Keterangan <i>Remarks</i>
KD		27	Koloni putih besar <i>Wide white colony</i>
<i>Nannochloropsis oculata</i>	1.025	16	Koloni putih kecil <i>Small white colony</i>

		tidak terhitung <i>Uncountable</i>	Koloni melayang <i>Swimming colony</i>
		6	Koloni putih besar <i>Wide white colony</i>
SH <i>Nannochloropsis</i> <i>oculata</i>	1.400	Tidak terhitung <i>Uncountable</i>	Koloni melayang <i>Swimming colony</i>
		30	Koloni putih besar <i>Wide white colony</i>
SP-1 <i>Chaetoceros</i> <i>ceratosporum</i>	810	20	Koloni putih kecil <i>Small white colony</i>
		14	Koloni putih besar <i>Wide white colony</i>
SP-2 <i>Chaetoceros</i> <i>ceratosporum</i>	10.800	9	Koloni putih kecil <i>Small white colony</i>

Karakterisasi dan Identifikasi Isolat Bakteri Hasil Isolasi dari Media Kultur Mikroalga

Isolat bakteri yang telah diisolasi dan dipurifikasi dilakukan *screening* berikutnya dan diidentifikasi dengan metode molekuler DNA yaitu dengan RAPD *fingerprint*. Hal ini dimaksudkan untuk menghindari kesamaan dari jenis *strain* hasil isolasi dan purifikasi sebelumnya. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa dari 37 isolat bakteri terdapat 22 isolat bakteri adalah *Vibrio*, sedangkan yang 15 isolat adalah bakteri non-*Vibrio*. Performansi fragmentasi DNA masing-masing isolat bakteri hasil RAPD *fingerprint* terlihat pada Gambar 2.





Gambar 2. Keragaan fragmentasi amplicon DNA hasil amplifikasi PCR dari isolat bakteri yang telah dipurifikasi. M: *marker 100 bp ladder*

Figure 2. *Performance of DNA amplicon fragmentation of PCR amplification from purified bacterial isolates. M: 100 bp ladder marker*

Hasil pemilihan isolat bakteri berdasarkan pada hasil RAPD *fingerprint* yang mempunyai karakter susunan fragmen berbeda menunjukkan bahwa bakteri tersebut berpeluang sebagai kandidat bakteri probiotik spesifik. Pada *C. ceratosporum* ada tujuh *strain* (kode CP-18, CP-20, CC-21, CC-22, CC-7, CCG, dan CCI), sedangkan untuk *N. oculata* terdapat delapan *strain* bakteri dengan kode: KD-4, KD-14, KD-15, KD-16, NN-5, NN-6, MS-9, dan MS-10. Semua *strain* bakteri tersebut selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas sintesis enzimatik dari ECP.

Aktivitas Enzimatik Produk Ekstraseluler Bakteri Terseleksi pada Kultur Mikroalga

Hasil pengujian terhadap aktivitas enzimatik dari produk ekstraseluler tujuh *strain* bakteri dari kultur *C. ceratosporum* dan delapan *strain* bakteri pada kultur *N. oculata*, ternyata bahwa

bakteri dengan kode CC-22, NN-5, dan NN-6 menunjukkan aktivitas enzimatis dengan nilai yang sama dan mempunyai reaksi positif sintesis daripada yang lain. Hal ini terlihat dari kemampuan bakteri dalam menghidrolisis casein (casease), *starch* (amilase), Tween-80 (lipase), dan urea (urease) (Tabel 4). Produk enzimatis dari bakteri tersebut diekspresikan dengan adanya gambaran zona jernih di sekitar pipa silinder pada agar. Nampaknya, produk ekstraseluler yang berupa enzim casease, amilase, lipase, dan urease merupakan sumber nutrisi baru bagi mikroalga untuk pertumbuhan dan pembelahan sel. Adanya produk enzimatis yang dihasilkan dari bakteri yang ditambahkan dalam kultur mikroalga berakibat pada peningkatan kepadatan sel dan metabolisme dalam menjaga fase stasioner yang lebih lama. Proses-proses metabolisme dalam sel mikroalga meliputi biosintesis (anabolisme) dan degradasi (katabolisme) dilakukan secara enzimatis dengan bantuan suatu enzim dan *carrier system*.

Tabel 4. Aktivitas enzimatis dari produk ekstra seluler bakteri terseleksi pada kultur *Chaetoceros ceratosporum* dan *Nannochloropsis oculata*

Table 4. Enzymatic activity of extra cellular product of selected bacteria strains on *Chaetoceros ceratosporum* and *Nannochloropsis oculata* culture

Kode bakteri	Sintesis enzimatis						
<i>Bacteria codes</i>	<i>Enzymatic synthesis</i>						
	Gelatinase	Casease	Amilase <i>Amylase</i>	Lecitinase <i>Lecithinase</i>	Lipase	Urease	Kitinase <i>Chitinase</i>
<i>Chaetoceros ceratosporum</i>							
CP-18	+	-	-	-	+	-	-
CP-20	-	-	+	+	-	-	-
CC-21	+	-	-	-	+	-	-
CC-22	-	+	+	-	+	+	-
CC-7	-	-	+	+	-	-	-
CCG	-	-	+	+	-	-	-
CCI	+	-	-	-	+	-	-
<i>Nannochloropsis oculata</i>							
KD-4	-	+	-	-	+	-	-
KD-14	+	-	-	-	+	-	-
KD-15	-	+	-	-	+	-	-
KD-16	+	-	-	-	+	-	-
NN-5	-	+	+	-	+	+	-
KN-6	-	+	+	-	+	+	-
MS-9	-	-	+	+	-	-	-
MS-10	-	+	-	-	+	-	-

Hasil identifikasi tiga isolat bakteri terseleksi untuk mikroalga melalui *sequencing* susunan nucleotida dan dilakukan Blast-N menunjukkan bahwa kemiripan yang tinggi (97,07-99%) antara sampel yang dianalisis dengan *sequence* DNA pada masing-masing nomor akses di GenBank. Nilai similaritas bakteri hasil Blast-N disajikan pada Tabel 5. Hasil *sequencing* tersebut selanjutnya merupakan nama *strain* bakteri masing-masing sesuai hasil yang sudah teridentifikasi yaitu *Marinobacter vinifirmus strain* CC-22, *Alteromonas sp. strain* NN-5, dan *Marinobacter hydrocarbonoclastic strain* NN-6.

Tabel 5. Similaritas sekuen DNA dari *strain* bakteri terseleksi pada kultur mikroalga dibandingkan dengan total sekuen gen pada GeneBank dengan masing-masing nomor akses

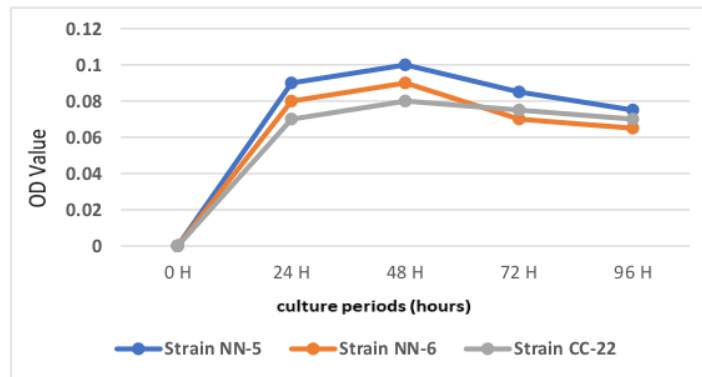
Table 5. Similarity of DNA sequence isolated from selected bacteria strains in microalgae culture compared of total gene sequence on GenBank from each accession number

Code samples	Description strain	Percentage similarity (max identity)		Accession
		Forward	Reverse	
CC-22	<i>Marinobacter vinifirmus</i>	98.0 %	97.07 %	KT4280429.1
NN-5	<i>Alteromonas sp.</i>	99.0 %	98.0 %	JQ309925.1
NN-6	<i>Marinobacter hydrocarbonoclastic</i>	98.0 %	99.0 %	JQ799112.1

Kultur *Strain* Bakteri Terseleksi

Dari hasil uji aktivitas enzimatik menunjukkan ada satu *strain* bakteri (*Marinobacter vinifirmus strain* CC-22) dari media kultur *C. ceratosporum* dan dua *strain* bakteri (*Alteromonas sp. strain* NN5, *Marinobacter hydrocarbonoclastic strain* NN-6) dari *N. oculata*. Pengkulturan tiga isolat bakteri tersebut menunjukkan kepadatan sel yang berbeda dalam waktu 96 jam inkubasi (Gambar 3). Kepadatan populasi bakteri pada 48 jam merupakan kepadatan tertinggi. Pada isolat *M. vinifirmus strain* CC 22 diperoleh kepadatan 14×10^8 CFU mL⁻¹ (nilai OD 0,08), sedangkan untuk kepadatan isolat *Alteromonas sp. strain* NN5 dan *M. hydrocarbonoclastic strain* NN-6 masing-masing sebesar 78×10^{10} CFU mL⁻¹ (nilai OD 0,10) dan 25×10^9 CFU mL⁻¹ (nilai OD 0,09). Kepadatan bakteri yang dikultur dalam *flask glass* (300

mL) masih menunjukkan kepadatan normal, karena pada kultur bakteri tersebut dilengkapi aerasi dengan Dismic Filter *size pore* 0,22 μm .



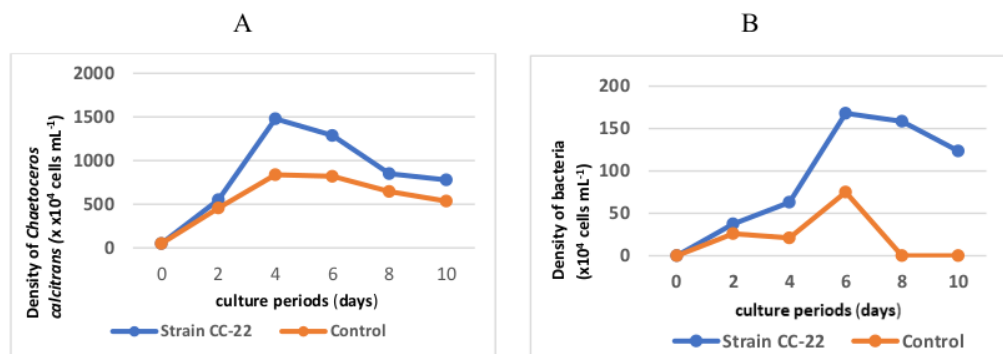
Gambar 3. Kepadatan sel dari tiga isolat bakteri terseleksi *Marinobacter vinifirmus* strain CC-22, *Alteromonas* sp. strain NN-5, dan *Marinobacter hydrocarbonoclastic* strain NN-6 yang diukur dengan spektrofotometer pada optical density 620 nm

Figure 3. Cell density from three selected bacteria isolates *Marinobacter vinifirmus* strain CC-22, *Alteromonas* sp. strain NN-5, dan *Marinobacter hydrocarbonoclastic* strain NN-6 measured by spectrophotometer with an optical density of 620 nm

Penggunaan Strain Bakteri Terseleksi untuk Pertumbuhan Mikroalga

Hasil pengujian isolat bakteri *M. vinifirmus* strain CC-22 dengan kepadatan 10^4 CFU mL⁻¹ dalam kultur *C. ceratosporum* volume 1000 mL menunjukkan hasil seperti tertera pada Gambar 4A. Pada perlakuan kontrol tidak ditambahkan isolat bakteri. Pengamatan terhadap populasi bakteri yang ada dalam media kultur disajikan pada Gambar 4B. Nampak bahwa pemberian bakteri *M. vinifirmus* strain CC-22 dengan kepadatan 10^4 CFU mL⁻¹ dapat memberikan performansi pertumbuhan *C. ceratosporum* yang lebih baik dan kepadatan sel yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (tanpa pemberian bakteri). Kepadatan *C. ceratosporum* dengan pemberian strain bakteri *M. vinifirmus* strain CC-22 dapat mencapai kepadatan tinggi ($14,79 \times 10^6$ sel mL⁻¹). Sementara kepadatan *C. ceratosporum* pada kontrol relatif rendah $8,38 \times 10^6$ sel mL⁻¹. Nampaknya, strain bakteri *M. vinifirmus* strain CC-22 dapat

menjadi kandidat *strain* bakteri spesifik yang berperan sebagai *probiotic agent* untuk memacu pertumbuhan mikroalga *C. ceratosporum*. Hasil pengamatan pertumbuhan *strain* bakteri di dalam media kultur *C. ceratosporum* menunjukkan adanya korelasi positif keberadaan bakteri dengan kepadatan mikroalga. Hal yang sama bila dibandingkan dengan kontrol (tanpa bakteri *M. vinifirmus strain* CC-22) maka populasi sel *C. ceratosporum* dan bakteri dalam media kultur juga rendah.



Gambar 4. Pola pertumbuhan *Chaetoceros ceratosporum* yang ditambahkan *strain* bakteri *Marinobacter vinifirmus strain* CC-22 (A) dan pola pertumbuhan bakteri *Marinobacter vinifirmus strain* CC-22 (B) dalam media kultur mikroalga

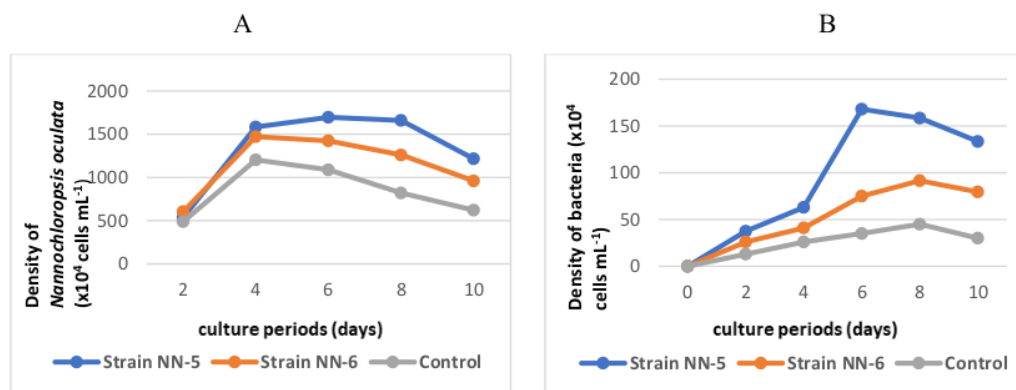
Figure 4. Growth pattern of *Chaetoceros ceratosporum* with supplementation of specific probiotic bacteria *Marinobacter vinifirmus strain* CC-22 (A) and growth pattern of bacteria *Marinobacter vinifirmus strain* CC-22 to the culture media

Interaksi antara mikroalga dan bakteri umumnya mencakup berbagai macam simbiosis kemitraan, termasuk mutualisme, hubungan biologis yaitu dua pihak atau lebih berasal dari spesies yang berbeda saling memfasilitasi satu sama lain untuk pertumbuhan dan perkembangan (Cooper & Smith, 2015; Ramanan *et al.*, 2016). Secara umum, mikroalga melepaskan bahan organik terlarut (*dissolved organic matter*) yang digunakan bakteri sebagai sumber energinya. Bakteri, pada gilirannya, melakukan remineralisasi nutrisi organik menjadi bentuk anorganik, agar mikroalga dapat memanfaatkannya. Dalam kasus mutualisme, suatu bakteri memberikan manfaat senyawa seperti vitamin B12 hingga mikroalga bermitra dengan imbalan karbon yang tetap tersedia (Grossman, 2016; Nef *et al.*, 2022).

Hasil pengamatan pada kultur *C. ceratosporum*, terdapat kecenderungan kesamaan pertumbuhan pada awal kultur antara perlakuan kontrol (tanpa penambahan bakteri *M. vinifirmus strain* CC-22) dan perlakuan penambahan *strain* bakteri *M. vinifirmus strain* CC-22. Hal ini terlihat adanya persamaan pertumbuhan pada fase *lag* yaitu pada inkubasi selama 2 hari. Pada fase eksponensial dan stasioner hingga fase kematian, kedua perlakuan menunjukkan laju pertumbuhan yang berbeda. Jumlah sel terbanyak pada perlakuan pemberian *M. vinifirmus strain* CC-22 adalah $14,79 \times 10^6$ sel mL⁻¹, sedangkan pada kontrol hanya $8,38 \times 10^6$ sel mL⁻¹. Persentase peningkatan kepadatan sel pada kultur *C. ceratosporum* dengan penambahan *strain* bakteri *M. vinifirmus* CC-22 sebesar 176% atau ada peningkatan kepadatan sel 1,76 kali dibandingkan dengan kontrol. Pengamatan terhadap performansi sel *C. ceratosporum* menunjukkan ² kualitas sel yang sehat (kandungan nutrisi, pigmentasi, dinding sel tidak keropos, dan sel tidak mengalami penggumpalan), kepadatan sel tinggi, umur fase stasioner pada kultur relatif lama (4 hari). Studi penggunaan bakteri untuk pemacuan pertumbuhan *C. ceratosporum* diharapkan dapat menstimulasi pertumbuhan mikroalga. Biodiversitas bakteri yang sangat kaya untuk diungkap perannya sebagai bakteri yang menguntungkan dalam kultur mikroalga akan dapat memberikan keuntungan. Dengan demikian nampaknya penggunaan bakteri dapat dijadikan alternatif dalam memperbaiki teknik pengkulturan mikroalga, terutama dalam meningkatkan pertumbuhan dan produktivitas mikroalga.

Hasil pengujian isolat bakteri *Alteromonas sp. strain* NN-5 dan *M. hydrocarbonoclastic strain* NN-6 dengan kepadatan 10^4 CFU mL⁻¹ dalam kultur *N. oculata* volume 1000 mL menunjukkan hasil seperti tertera pada Gambar 5. Pada perlakuan kontrol tidak ditambahkan isolat bakteri. Nampak bahwa pemberian *strain* bakteri, menunjukkan perbedaan pertumbuhan yang signifikan. Hal ini mungkin kemampuan isolat bakteri *Alteromonas sp. strain* NN-5 dan *M. hydrocarbonoclastic strain* NN-6 berbeda dalam melakukan peran mengurai secara enzimatik terhadap protein, karbohidrat, lipid, dan urea. Walaupun dengan kepadatan bakteri

yang sama, namun *M. hydrocarbonoclastic strain* NN-6 tidak efektif dalam menstimulasi pertumbuhan mikroalga *N. oculata*. Pada kontrol, kepadatan mikroalga cenderung lebih rendah tanpa adanya penambahan *strain* bakteri. Pemberian bakteri *Alteromonas* sp. *strain* NN-5 dan *M. hydrocarbonoclastic strain* NN-6 dengan kepadatan 10^4 CFU mL⁻¹, nampak ada kecenderungan perbedaan pertumbuhan *N. oculata*.



Gambar 5. Pola pertumbuhan *Nannochloropsis oculata* yang ditambahkan isolat bakteri *Alteromonas* sp. *strain* NN-5 dan *Marinobacter hydrocarbonoclastic strain* NN-6 (A) dan pola pertumbuhan bakteri *Alteromonas* sp. *strain* NN-5 dan *Marinobacter hydrocarbonoclastic strain* NN-6 (B) dalam media kultur mikroalga

Figure 5. Growth pattern of *Nannochloropsis oculata* with supplementation of selected bacteria *Alteromonas* sp. *strain* NN-5 and *Marinobacter hydrocarbonoclastic strain* NN-6 (A) and growth pattern of bacteria *Alteromonas* sp. *strain* NN-5 and *Marinobacter hydrocarbonoclastic strain* NN-6 (B) in the culture media of microalgae

Hingga hari ke-8 kepadatan *N. oculata* masih stabil tumbuh dengan suplementasi *Alteromonas* sp. *strain* NN-5, sedangkan pada *M. hydrocarbonoclastic strain* NN-6 dan kontrol sudah menunjukkan penurunan. Pada kultur mikroalga *N. oculata* volume 1000 mL nampak jelas stimulasi bakteri *Alteromonas* sp. *strain* NN-5 bagi pertumbuhan, dibandingkan dengan *M. hydrocarbonoclastic strain* NN-6 dan kontrol. Dengan demikian, ada peluang bahwa isolat bakteri *Alteromonas* sp. *strain* NN-5 dapat dijadikan *strain* bakteri spesifik sebagai *probiotic agent* dalam pemacuan pertumbuhan *N. oculata* skala terkontrol.

Hasil pengamatan pada kultur *N. oculata*, terlihat bahwa pertumbuhan pada fase lag dicapai pada hari kedua untuk tiap perlakuan. Fase eksponensial dan stasioner relatif lebih panjang dengan penambahan *Alteromonas* sp. strain NN-5 yaitu sejak hari ke-4 hingga 8. Hal ini dapat terjadi diduga karena sel-sel *N. oculata* memasuki periode kriptik, yaitu sel-sel yang masih hidup memanfaatkan tambahan nutrisi dari sel-sel mikroalga yang telah lisis dan ketersediaan produk ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri spesifik *Alteromonas* sp. strain NN-5 untuk pertumbuhannya. Kepadatan sel tertinggi pada penambahan bakteri *Alteromonas* sp. strain NN-5 adalah $18,5 \times 10^6$ sel mL⁻¹, pada *M. hydrocarbonoclastic* NN-6 dan kontrol masing-masing sebanyak $13,45 \times 10^6$ sel mL⁻¹ dan $11,02 \times 10^6$ sel mL⁻¹. Persentase peningkatan kepadatan sel pada kultur *N. oculata* dengan penambahan bakteri *Alteromonas* sp. strain NN-5 sebesar 156%, sedangkan dengan penambahan bakteri *M. hydrocarbonoclastic* NN-6 sebesar 131% dibandingkan dengan kontrol.

Perbedaan kepadatan sel dalam kultur *C. ceratosporum* atau *N. oculata* antara lain disebabkan adanya pembelahan sel menjadi individu baru yang muncul per satuan waktu tertentu. Pertumbuhan spesifik pada kultur *C. ceratosporum* dan *N. oculata* umumnya akan meningkat hingga mencapai laju pertumbuhan maksimum, kemudian menurun karena terjadi penurunan kualitas dan kuantitas nutrisi serta berbagai faktor abiotik lainnya. Penelitian oleh Mazli *et al.* (2024) telah menseleksi dan mengkarakterisasi bakteri pemacu pertumbuhan mikroalga yang cocok untuk meningkatkan produksi mikroalga *Cyclotella meneghiniana* dengan karakter pelarutan fosfor, produksi asam indol-3-asetat (IAA), dan fiksasi nitrogen. Hubungan antara mikroalga dan bakteri dalam suatu lingkungan mikro mempunyai peran penting dalam meningkatkan kualitas dan kuantitas produksi mikroalga, yang pada gilirannya akan memengaruhi pertumbuhan organisme pemangsa seperti zooplankton dan memperbaiki kualitas nutrisinya, sehingga memilih dan mengkarakterisasi bakteri pemacu pertumbuhan

mikroalga yang cocok untuk meningkatkan produksi mikroalga adalah proses penting karena tidak semua bakteri dapat menstimulasi pertumbuhan mikroalga.

Chaetoceros ceratosporum dan *N. oculata* adalah salah satu species diatom dan nondiatom yang penting dan biasa dimanfaatkan sebagai sumber makanan hidup di budidaya terutama pembenihan ikan atau udang, karena komposisi asam lemak esensial *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA) yang tinggi. Hal yang sama juga dilakukan terhadap spesies diatom *Cyclotella* sp. (Cupo *et al.*, 2021; Karrar *et al.*, 2024). Oleh karena itu, banyak upaya untuk meningkatkan produksi beberapa spesies diatom dan nondiatom tersebut dengan berbagai cara (Cupo *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2017; Pacheco *et al.*, 2015). Sementara, produk primer yang dihasilkan dari mikroalga mempunyai nilai guna tinggi di antaranya asam lemak, pigmen, dan polisakarida. Metabolit tersebut berperan dalam pertumbuhan dan perkembangbiakan ikan dan udang. Sebagai contoh, mikroalga dari jenis *Chaetoceros gracilis* mempunyai kandungan nutrisi berupa 25,56% SAFA, 34,77% MUFA, 39,55% PUFA. Berat kering *C. gracilis* mengandung 27% air, 25% air, 12,1% lemak, 20,27% protein dan 15.63% karbohidrat. Kandungan komponen aktif pada biomas kering adalah alkaloids, terpenoids, karbohidrat, gula dengan konsentrasi rendah, dan asam amino, sedangkan calcium merupakan kandungan mineral tertinggi pada *C. gracilis* (Setyaningsih *et al.*, 2023).

Dengan demikian, konsorsium mikroalga-bakteri yang sesuai dapat dibentuk untuk meningkatkan pertumbuhan dan kualitas nutrisi mikroalga yang dapat digunakan sebagai pakan alami yang efektif untuk kepentingan komersial produksi benih ikan, *crustacea*, dan hewan akuatik lainnya.

KESIMPULAN

Diperoleh dua isolat bakteri terseleksi yaitu bakteri *M. vinifirmus* strain CC-22 dan *Alteromonas* sp. strain NN-5 yang berpotensi sebagai *probiotic agent* untuk menstimulasi

pertumbuhan *C. ceratosporum* dan *N. oculata*. Penambahan isolat bakteri *M. vinifirmus strain* CC-22 dan *Alteromonas sp. strain* NN-5 masing-masing dapat meningkatkan pertumbuhan mikroalga *C. ceratosporum* sebesar 1,76 kali (176 %) dan *N. oculata* sebesar 1,56 kali (156 %) pada fase stasioner.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada peneliti dan teknisi litkayasa Laboratorium Bioteknologi, Laboratorium Pakan dan Nutrisi, KKI Biota Laut BRIN Gondol yang telah berpartisipasi dan membantu pada kegiatan penelitian ini.

Ni Nengah Suriadnyani

ORIGINALITY REPORT

4%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	repository.ub.ac.id Internet	97 words — 2%
2	ojs3.unpatti.ac.id Internet	62 words — 1%
3	id.scribd.com Internet	57 words — 1%
4	repository.unair.ac.id Internet	32 words — 1%

EXCLUDE QUOTES ON

EXCLUDE BIBLIOGRAPHY ON

EXCLUDE SOURCES < 1%

EXCLUDE MATCHES < 10 WORDS