

Eksplorasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Karang Lunak sebagai Alternatif Sumber Senyawa Bioaktif: Uji Hayati Antibakteri

Esti Harpeni

Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Lampung

Abstract

*Soft coral has a significant function in the ecology of coral reef which produces secondary metabolites. One of very serious problems with coral reef ecosystem related to secondary metabolite improvement was coral supply because of need of many soft corals producing a little amount of secondary metabolites. The purposes of this research were to isolate and to select soft coral bacteria that have ability to produce antibacterial having been used to inhibit *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The research was conducted from March 31th to November 2nd, 2005 by using description method. Sampling was carried out at Pulau Tegal Waters on two different coral genera, namely *Briareum* and *Sinularia* at three different sites. Laboratory studies were performed at Environment and Healthy Monitoring Fish Laboratory at Lampung Marine Agricultural. The results showed that five of 125 isolates obtained had potential of producing antibacterial that have been used to inhibit *E.coli* and *S. aureus*. The coral ability to inhibit *E.coli* and *S. aureus* was indicated by inhibition zone around soft coral bacteria colonies. Morphology and biochemistry characterization of potentially inhibiting isolates against *E. coli* and *S. aureus* resulted in strains *Staphylococcus* sp. (isolate code B1110), *Plesiomonas* sp. (isolate code B1111), *Actinobacillus* sp. (isolate code B216), *Actinomyces* sp. (isolate code B114), and *Aerococcus* sp. (isolate code S1112).*

Keywords: *secondary metabolite, bacteria, association, soft coral, inhibition zone*

Pendahuluan

Indonesia sebagai negara megabiodiversitas terbesar kedua di dunia setelah Brazil memiliki keanekaragaman hayati yang sangat melimpah, termasuk di dalamnya berbagai produk hayati laut. Keanekaragaman ini memberikan kontribusi yang besar bagi kekayaan sumber plasma nutfah di Indonesia khususnya dan di dunia umumnya.

Saat ini produk hayati merupakan struktur utama dalam perkembangan dunia farmasi dan agrokimia yang tidak dapat dipungkiri (Proksch, 2000). Meskipun sudah banyak usaha untuk mengarakterisasi produk hayati, semuanya baru terbatas pada tanaman tingkat tinggi. Belakangan ini perhatian mulai banyak ditujukan kepada produk hayati laut sebagai struktur kimia yang unik dengan aktivitas biologisnya (senyawa bioaktif).

Sumber-sumber senyawa bioaktif banyak ditemukan di lautan seperti pada organisme laut, termasuk karang lunak. Keberadaan senyawa bioaktif pada organisme laut diindikasikan erat kaitannya dengan mikroorganisme yang berasosiasi dengannya. Keberadaan mikroorganisme di laut sangat melimpah jumlahnya, bahkan permukaan karang lunak yang dilapisi oleh lendir/mukus sering kali dikolonisasi oleh bakteri atau mikroorganisme lain (Paul *et al.*, 1986; Coffroth, 1990). Mukus yang terdapat pada karang lunak berfungsi sebagai penyangga pertumbuhan bakteri dengan cara membentuk substrat untuk bakteri heterotrofik. Karang lunak diketahui menghasilkan senyawa bioaktif dengan jenis, konsentrasi, serta fungsi yang amat beraneka ragam antar spesies. Menurut Sammarco dan Coll (1990), senyawa bioaktif pada organisme laut berperan penting dalam ekologi karang lunak tersebut, terutama untuk perlindungan terhadap predator, kompetisi ruang hidup, reproduksi, *antifouling*, dan antimikroba.

Sejak tahun 1995, terjadi kecenderungan kurangnya perhatian dalam pencarian senyawa baru dari sumber-sumber tradisional seperti makroalga, moluska, tunikata,

oktokoral. Demikian pula, jumlah publikasi tahunan senyawa bioaktif dari binatang *sponge* laut relatif stabil.

Di sisi lain, senyawa bioaktif dari mikroorganisme berkembang cukup pesat, yang disebabkan oleh adanya dugaan bahwa sejumlah senyawa bioaktif yang diperoleh dari alga dan binatang avertebrata laut lainnya, juga dihasilkan oleh mikroorganisme yang berasosiasi dengannya (Fenical, 1993; Pietra, 1997; Bernan *et al.*, 1997; Faulkner *et al.*, 2000; Jensen and Fenical, 2000). Meskipun masih terlalu dini untuk menentukan kepastiannya, dapat dikatakan bahwa senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh mikroorganisme mungkin berbeda dengan senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh inang avertebrata.

Hambatan utama dalam pengembangan hampir semua produk hayati laut dari golongan avertebrata laut yang saat ini tengah mengalami proses evaluasi dan pengembangan di bidang industri farmasi adalah masalah pasokan. Masalah kebanyakan senyawa bioaktif yang berasal dari avertebrata laut, termasuk karang lunak, adalah jumlahnya yang sangat sedikit, kadang hanya kurang dari 10^{-6} % dari berat basah (Proksch *et al.*, 2002). Di samping itu, telah terbukti sangat sulit, bahkan kadang tidak mungkin, menyediakan sejumlah besar senyawa bioaktif dari avertebrata laut karena jumlahnya yang terbatas dalam organisme penghasil, atau karena jumlah organisme yang terbatas, atau karena masalah geografi, musim, bahkan variasi seksual.

Sejalan dengan meningkatnya kesadaran masyarakat tentang ekosistem terumbu karang lunak, maka pemanfaatan karang lunak sebagai sumber senyawa bioaktif dipandang dapat menyebabkan suatu kerusakan dan mengganggu keseimbangan ekosistem terumbu karang lunak. Hal ini terjadi karena untuk mendapatkan jumlah senyawa bioaktif yang cukup dibutuhkan sejumlah besar karang lunak sehingga akan sangat tidak menguntungkan terutama dalam upaya perlindungan dan pemanfaatan ekosistem terumbu karang yang lestari.

Dengan mengarakterisasi bakteri yang menghasilkan senyawa bioaktif yang berperan dalam proses interaksi ekologis akan diperoleh alternatif senyawa bioaktif dari ekosistem terumbu karang yang selama ini dihasilkan oleh karang lunak. Hal ini dapat digunakan sebagai alternatif strategi dalam perlindungan ekosistem terumbu karang.

Eksplorasi karang lunak sebagai sumber senyawa bioaktif yang dilakukan terus-menerus akan merugikan ekosistem terumbu karang karena untuk memenuhi kebutuhan industri dibutuhkan karang lunak dengan jumlah yang sangat besar dengan perolehan senyawa aktif yang relatif kecil. Pencarian alternatif bagi senyawa bioaktif yang selama ini banyak diperoleh dari karang lunak sudah menjadi kebutuhan yang sangat mendesak untuk menyelamatkan ekosistem pesisir yang sangat produktif ini. Oleh karena itu, pencarian senyawa bioaktif alternatif dari ekosistem terumbu karang yang ramah lingkungan telah menjadi pekerjaan rumah yang harus segera dicarikan pemecahannya secara multidisiplin dan serius.

Senyawa bioaktif yang disintesis oleh bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak merupakan produk hayati laut (*marine natural products*) yang dapat merupakan alternatif bagi sumber senyawa bioaktif baru. Penelusuran biologis menggunakan teknik agar difusi akan dilakukan sebagai skrining terhadap bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak sehingga akan menghasilkan data dasar mengenai bakteri yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber senyawa bioaktif. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menyeleksi bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak, yang potensial menghasilkan senyawa bioaktif penghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Materi dan Metode

Penelitian dilaksanakan dari tanggal 31 Maret hingga 20 Juni 2005. Pengambilan contoh dilakukan di perairan Pulau Tegal, Lampung. Penanganan contoh dilakukan di Laboratorium Lingkungan dan Kesehatan Ikan, Balai Budidaya Laut, Lampung.

Pengambilan contoh karang lunak dilakukan di tiga stasiun yang ditentukan dengan jarak masing-masing 10, 20, dan 30 meter dari garis pantai dengan penyelaman SCUBA,

dan contoh selanjutnya dimasukkan ke dalam erlenmeyer steril dan dimasukkan ke dalam *cool box* untuk dibawa ke laboratorium sebagai preparasi contoh.

Sebanyak 15,0 g *Bacto-agar*, 5,0 g *Bacto-peptone*; 1,0 g *yeast extract*; dan 19,5 mg feri fosfat dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang kemudian dituangi air laut steril hingga mencapai volume 1l. Labu erlenmeyer tersebut kemudian dipanaskan di atas *hot plate* hingga mendidih dan homogen. Nilai pH ditentukan 7,5 hingga 7,6 dan kemudian media tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 20 menit.

Metode yang digunakan dalam mengisolasi bakteri adalah metode *spread plating* (penaburan). Contoh karang lunak dari masing-masing stasiun ditempatkan pada cawan petri steril yang berisi air laut steril. Untuk memperoleh pengenceran 10^{-1} , masing-masing contoh karang lunak diambil 10 g, dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 90 ml air laut steril lalu dikocok hingga homogen. Dari pengenceran 10^{-1} diambil 1 ml contoh air menggunakan pipet steril, yang kemudian dimasukkan ke dalam 9 ml air laut steril untuk memperoleh pengenceran 10^{-2} . Dari pengenceran tersebut, masing-masing diambil 1 ml contoh air menggunakan pipet steril dan dimasukkan ke dalam masing-masing cawan petri steril yang telah berisi media Zobell 2216E steril sebanyak 15 ml. Cawan petri tersebut selanjutnya dibungkus dengan plastik pembungkus dan diinkubasikan selama 2 x 24 jam pada suhu kamar.

Pemisahan dan pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan metode goresan (*streak method*). Dari masing-masing cawan petri pada tiap pengenceran diambil beberapa koloni bakteri yang menampakkan morfologi yang berbeda. Selanjutnya, masing-masing koloni bakteri tersebut digoreskan pada permukaan media Zobell 2216E steril pada masing-masing cawan petri yang telah disiapkan. Selanjutnya, cawan petri diinkubasikan pada suhu kamar selama 2 x 24 jam dan diamati pertumbuhannya. Apabila masih terdapat campuran bakteri pada cawan petri tersebut, maka dilakukan pemisahan kembali dengan metode goresan hingga diperoleh kultur murni pada masing-masing cawan petri.

Kultur murni isolat bakteri dipindahkan ke dalam media agar miring Zobell 2216E pada tabung reaksi dengan teknik goresan. Pemindahan dan pemeliharaan kultur dilakukan tiap empat minggu sekali dengan cara mentransfer kultur murni ke dalam media agar miring yang baru.

Seleksi dilakukan dengan mengusapkan masing-masing isolat bakteri uji (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*) pada permukaan media Zobell 2216E secara merata menggunakan *cotton bud* steril. Selanjutnya, isolat ditetesi dengan 10 µl isolat bakteri karang lunak. Media tersebut diinkubasikan pada suhu 30°C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan melihat diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri di sekeliling koloni bakteri karang lunak. Zona hambatan yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm. Hasil positif diperoleh dengan menyeleksi koloni bakteri yang menghasilkan zona hambatan terhadap strain bakteri uji.

Karakterisasi morfologi dan biokimia isolat bakteri karang lunak potensial penghambat *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dilakukan sebagai berikut. Pengamatan morfologi sel dilakukan dengan mengamati bentuk dan hasil pewarnaan gram. Pewarnaan gram untuk melihat isolat termasuk ke dalam Gram positif atau Gram negatif. Pergerakan bakteri diamati dengan melakukan penanaman isolat pada medium semipadat dengan komposisi 0,3 % agar.

Uji pembentukan indol dilakukan untuk melihat kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi asam amino triptofan yang akan menghasilkan indol. Medium tripton diinokulasi dengan koloni bakteri dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 24 jam. Setengah ml reagen Kovac dituangkan ke dalam tabung biakan. Hasil uji dianggap positif bila terjadi pembentukan warna merah pada lapisan alkohol yang menunjukkan keberadaan indol.

Tabung medium 'Sitrat-Koser' diinokulasi dengan biakan murni dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35 °C. Hasil uji positif ditunjukkan dengan adanya kekeruhan.

Uji katalase merupakan salah satu uji untuk melihat kemampuan dalam mendegradasi H₂O₂ menjadi air dan oksigen dengan perantaraan enzim katalase. Uji ini

dilakukan dengan menambahkan 0,5 ml 10 % H₂O₂ pada medium. Hasil uji dianggap positif bila terlihat pembentukan gelembung udara di sekitar koloni.

Penguraian asam amino yang mengandung sulfur menunjukkan adanya pembentukan H₂S oleh bakteri. Ion Fe dalam media biakan bereaksi dengan H₂S menghasilkan senyawa berwarna hitam. Media yang digunakan adalah TSIA.

Uji pembentukan asam dari glukosa merupakan uji untuk mendeterminasi kemampuan bakteri uji dalam mendegradasi dan memfermentasikan karbohidrat yang ditunjukkan oleh terbentuknya gas. Koloni biakan murni ditanam ke dalam tabung medium fermentasi karbohidrat, kemudian diinkubasi pada suhu 35 °C selama 2 hingga 4 hari. Reaksi positif ditunjukkan oleh adanya perubahan warna indikator (bromokresol ungu) pada medium, yaitu warna ungu ke arah kuning.

Uji pertumbuhan dalam kondisi aerob dan anaerob dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri uji menggunakan O₂ untuk respirasi sel. Pertumbuhan bakteri di permukaan agar menunjukkan pertumbuhan aerob, sedangkan pertumbuhan di dasar tabung menunjukkan pertumbuhan anaerob.

Uji reduksi ini digunakan untuk mendeterminasi kemampuan bakteri dalam mereduksi nitrat menjadi nitrit yang ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah. Uji ini bertujuan untuk meneliti produksi enzim amilase dan aktivitas hidrolitik. Uji ini bertujuan untuk mendeteksi fermentasi glukosa dan produksi asam dengan pH 4,5 atau kurang. Uji ini dilakukan untuk melihat kemampuan dalam menghasilkan produk akhir yang bersifat nonasam atau netral dari asam organik seperti asimetil karbinol yang merupakan hasil metabolisme glukosa. Biakan murni diinokulasi ke dalam tabung medium cair VP dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 48 jam. Sejumlah 1 ml biakan ditambah 0,2 ml larutan 40% KOH dan dikocok, kemudian ditambah 0,6 ml larutan alfa-naftol, dikocok dan diinkubasikan selama 2 hingga 4 jam. Warna merah jambu menunjukkan reaksi positif. Uji dilakukan untuk meneliti produksi enzim proteolitik gelatinase. Uji ini bertujuan untuk meneliti produksi enzim urease. Hasil uji dikatakan positif bila menunjukkan warna merah dan negatif jika tidak berwarna.

Dokumentasi terhadap contoh karang lunak dilakukan dengan pengambilan gambar menggunakan *underwater camera*. Kemudian, dilakukan identifikasi terhadap contoh karang lunak yang diperoleh.

Data penelitian ini dianalisis secara deskriptif pada uji kualitatif daya hambat (*bioassay* antibakteri) *indigeneous* strain bakteri karang lunak terhadap strain bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Kedua strain bakteri uji tersebut diambil berdasarkan atas pertimbangan patogenitasnya terhadap manusia.

Hasil dan Pembahasan

Hasil identifikasi karang lunak menunjukkan bahwa karang lunak yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari genus *Briareum* dan *Sinularia*. Pemilihan genus karang lunak ini memperhatikan pertimbangan jumlahnya di perairan Pulau Tegal, Lampung, yang masih relatif banyak bila dibandingkan dengan genus karang lunak yang lain. Dengan pertimbangan ini pula diharapkan didapatkan lebih banyak isolat bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak sebagai kandidat potensial penghasil senyawa bioaktif.

Hasil isolasi bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak (*Briareum* dan *Sinularia*) di perairan Pulau Tegal, Lampung, disajikan dalam Tabel 1 dan Gambar 1. Tabel tersebut menunjukkan bahwa jumlah total isolat bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak adalah 125 isolat.

Tabel 1. Hasil isolasi bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak

Genus Karang Lunak	Jumlah Isolat
<i>Briareum</i>	83
<i>Sinularia</i>	42
Total	125



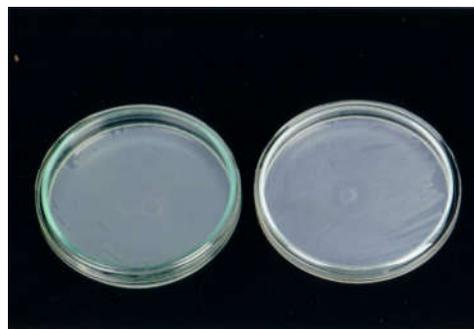
Gambar 1. Koloni bakteri yang tumbuh pada media Zobell 2216E
Figure 1. Bacterial collony grown on Zobell 2216E media

Hasil uji hayati antibakteri (Tabel 2 dan Gambar 2) yang dilakukan dengan melawankan strain *indigeneous* dengan strain uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, menunjukkan bahwa hanya 4 % (5 isolat) dari jumlah total isolat yang diperoleh (125 isolat) memiliki potensi menghasilkan senyawa antibakteri, khususnya bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Hal ini dilihat dari kemampuan bateri karang lunak (strain *indigeneous*) dalam menghambat strain uji *E. coli* dan *S. aureus*. Kemampuan penghambatan terhadap strain uji kedua bakteri tersebut ditunjukkan oleh zona hambatan di sekeliling koloni bakteri karang lunak.

Tabel 2. Hasil uji penghambatan (kualitatif) bakteri karang lunak terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Table 2. Qualitative inhibition test of soft corral bacteria on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Genus Karang Lunak	Jumlah Isolat	Jumlah Isolat Potensial	Persentase (%)
<i>Briareum</i>	83	4	4,82
<i>Sinularia</i>	42	1	2,38
Total	125	5	4,00



Gambar 2. Hasil uji penghambatan (kualitatif) bakteri karang lunak terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (kiri: hasil negatif, kanan: hasil positif)

Figure 3. Qualitative inhibition test of soft corral bacteria on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (left: negative, right: positive)

Tiga dari keempat isolat bakteri karang lunak dari genus *Briareum* mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *S. aureus*, yaitu isolat dengan kode B1I10, B2I11 dan B2I6. Sementara itu, satu isolat bakteri karang lunak dari genus *Briareum* mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *E. coli*, yaitu isolat berkode B1I4. Isolat dengan kode S1III2 dari genus *Sinularia* mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *S. aureus*. Bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak yang potensial menghasilkan senyawa bioaktif antibakteri memiliki karakteristik fisik yang dapat diamati secara visual, yaitu memiliki pigmen tubuh yang mencolok (Radjasa *et al.*, 1999). Pigmen pada bakteri ini menampilkan warna seperti kuning, oranye, merah muda, ungu, hitam, dan biru. Hasil pengukuran zona hambatan pertumbuhan bakteri di sekeliling koloni bakteri karang lunak dengan menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm tersaji dalam Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengukuran zona hambatan

Table 3. Measurement of inhibitory zone

Kode Isolat Karang Lunak	Hasil Pengukuran (cm)
B1I10	0,86
B1I11	1,26
B2I6	2,36
B1I4	2,60
S1III2	2,50

Hasil karakterisasi morfologi dan biokimiawi 5 isolat bakteri yang potensial menghambat bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus* berdasarkan atas standar prosedur dalam *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Lay, 1994) disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil karakterisasi morfologi dan biokimiawi isolat bakteri potensial penghambat *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*Table 4. Morphological and biochemical characteristics of bacterial isolate capable of inhibiting *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Kode Isolat Karang Lunak	Hasil Karakterisasi
B1I10	<i>Staphylococcus</i> sp.
B1I11	<i>Plesiomonas</i> sp.
B2I6	<i>Actinobacillus</i> sp.
B1I4	<i>Actinomyces</i> sp.
S1III2	<i>Aerococcus</i> sp.

Kesimpulan

Isolat bakteri yang dapat diisolasi dari jaringan karang lunak ada 125 isolat. Sebanyak 4% dari total isolat bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak potensial menghasilkan senyawa bioaktif antibakteri, khususnya bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Isolat bakteri karang lunak yang terkarakterisasi mampu menghasilkan senyawa bioaktif (antibakteri) adalah *Staphylococcus* sp., *Plesiomonas* sp., *Actinobacillus* sp., *Actinomyces* sp., dan *Aerococcus* sp.

Daftar Pustaka

- Bernan, V.S., M. Greenstein, and W.M. Maise. 1997. Marine microorganisms as a source of new natural products. *Adv. Appl. Microbiol.* 43: 57-90.
- Coffroth, M.J. 1990. The function and fate of mucous sheets produced by reef coelenterates. *Proc. The 6th Int. Coral Reef Symp. Australia 2*: 15-20
- Faulkner, D.J., M.K. Harper., M.G. Haygood., C.E. Salomon, and E.W. Schmidt. 2000. Symbiotic Bacteria in Sponges: Sources of Bioactive Substances. In: Fusetani, N (Ed). *Drugs from the Sea*, Basel: Karger. 107-119.
- Fenical, W. 1993. Chemical studies of marine bacteria: developing a new source. *Chem. Rev.* 93: 1673-1683.
- Jensen, P.R., and W. Fenical. 2000. Marine Microorganisms and Drug Discovery: Current Status and Future Potential. In: Fusetani, N (Ed). *Drugs from the Sea*, Basel: Karger. 6-29.
- Lay, B. W. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT RajaGrafindo Persada, Jakarta. 155 hlm.
- Paul, J.H., M.E. DeFlaun, and W,H, Jeffrey. 1986. Elevated levels of microbial activity in the coral surface microlayer. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 33: 29-40.
- Pietra, F. 1997. Secondary metabolites from marine microorganisms- bacteria, protozoa, algae and fungi-achievements and perspectives. *J. Nat. Prod.* 14: 453-464.
- Proksch. 2000. Bioactive natural products from marine invertebrates and associated microorganisms. *Proceeding International Symposium on Marine Biotechnology*, Jakarta. Pp 6-14.
- Proksch, P., R.A. Edrada, and R Ebel. 2002. Drugs from the Seas Current Status and Microbiological Implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 125-134.
- Radjasa, O.K., Sabdono, A., and Suharsono. 1999. The growth inhibition of marine biofilm-forming bacteria by the crude extract of soft coral *Sinularia* sp. *J. Coastal. Development* 2: 329-334.
- Sammarco, P.W. and J. C. Coll 1990. Lack of predictability in terpenoid function: Multiple roles and integration with related adaption in soft corals. *J. Chem. Ecol.* (16) 1: 273-289.