

Bioprospeksi dan Identifikasi Molekuler Bakteri yang Berasosiasi dengan Alga Hijau sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri

Bioprospecting and Molecular-Based Identification of Green Algae - Associated Bacteria as an Antibacterial Compound Producer

Rizky Panji Nugroho, Anto Budiharjo, Endang Kusdiyantini

Fakultas Sains dan Matematika, Jurusan Biologi Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH. Tembalang Semarang Indonesia 50275. Telp. (024) 70600484
kusdiyantini@undip.ac.id

Abstract: Bacteria are ubiquitous and could grow in various environments, including those associated with marine organisms such as algae, sponge, sea grass and soft corals. For these organisms, bacteria help building their active defense mechanisms by producing secondary metabolites such as antibacterial compounds. This research aimed to study the potency of seaweed-associated bacteria in producing antibacterial compounds. The seaweed used were *Halimeda macroloba*, *Caulerpa racemosa* dan *Ulva* sp. The results of isolation found five bacteria: one from *H. macroloba*, three from *C. racemosa*, and one from *Ulva* sp. Antibacterial assays was done by measuring inhibition zone to the growth of three bacteria: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Bacteria Isolated from *H. macroloba* showed the highest inhibition zone towards *P. aeruginosa* of 18.1 mm. Using molecular 16S rRNA identification, this isolate showed similarity to *Idiomarina fontislapidosi* strain HME8844. Biochemical tests showed that this isolate was negative to ferment the sugar of arabinose, fructose and sucrose, and also negative to amylum hydrolysis.

Keywords: Seaweed-Associated bacteria, antibacterial compounds, Seaweed

1. PENDAHULUAN

Bakteri asosiasi merupakan komunitas bakteri yang hidup bersama dengan biota lain dan melakukan berbagai interaksi yang paling penting dan mendasar dalam ekologi di lingkungan laut (Munn, 2004). Asosiasi bakteri dengan organisme laut dapat mempengaruhi proses metabolisme, oleh karena itu bakteri asosiasi memiliki kecenderungan menghasilkan senyawa bioaktif yang dapat digunakan sebagai pertahanan terhadap patogen dan organisme *fouling* (Murniasih, 2005). Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh asosiasi mikroba dengan organisme laut tersebut merupakan senyawa metabolit sekunder yang dapat sama dengan yang dihasilkan oleh organisme inangnya (Watermann, 1999; Burgess *et al.*, 2003).

Penelitian bakteri pada lingkungan laut telah banyak dilakukan seperti isolasi dan identifikasi mikroba simbiosis sponge *Axinella* sp. (Abdullah, 2006). Muliani *et al.* (2003) mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri asal laut Sulawesi untuk biokontrol penyakit vibriosis pada larva udang windu. Ravikumar *et al.* (2010) melakukan penelitian yaitu mengenai potensi bioaktif dari

bakteri lamun sebagai antibakteri dari bakteri patogen manusia yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dari jenis lamun *Cymodocea serrulata* yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* dan *Streptococcus aeruginosa*, sedangkan Dzeha *et al.* (2003) menyatakan bahwa senyawa bioaktif yang disebut klonasterol, merupakan triterpenoid terdapat pada *Halimeda macroloba*. Terpenoid berperan penting sebagai antibakteri yang bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat, sehingga mengakibatkan rusaknya porin.

Pentingnya peran alga dan bakteri yang berasosiasi dalam menghasilkan metabolit sekunder memungkinkan untuk mendapatkan senyawa alternatif sebagai antibakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah isolasi dan identifikasi secara morfologi dan molekuler bakteri yang berasosiasi dengan alga hijau *Halimeda macroloba*, *Caulerpa racemosa*, dan *Ulva* sp dan menguji potensi antibakteri dari isolat bakteri hasil isolasi tersebut



2. METODE

2.1. Pengambilan sampel

Sampel alga *Halimeda macroloba* berasal dari Karimunjawa, Jepara Jawa-Tengah; sedangkan *Caulerpa racemosa* dan *Ulva* sp. berasal dari Kutuh Bali. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara memotong ujung thallus, kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik dan diberi label sesuai dengan tempat, waktu serta tanggal pengambilan sampel. Sampel selanjutnya dimasukkan ke dalam *cool box* agar tetap terjaga kesegarannya, kemudian di analisis di laboratorium.

2.2. Isolasi dan purifikasi bakteri

Penanaman bakteri yang berasosiasi dengan alga dilakukan dengan metode sebaran menurut Madigan (2012). Sampel alga dibersihkan dengan air laut steril dan dihancurkan dengan cara dipotong-potong kecil dan ditumbuk menggunakan mortar dan pastel, selanjutnya 1 g sampel yang telah cukup halus tersebut dimasukkan ke dalam 9 ml air laut steril, dengan demikian diperoleh pengenceran sampel sebesar 10^{-1} . Pengenceran bertingkat selanjutnya dilakukan pengenceran 10^{-1} tersebut, sehingga diperoleh pengenceran sampel 10^{-5} . Pengenceran seri 10^{-4} dan 10^{-5} tersebut selanjutnya diambil 100 μ l sampel dan disebarkan ke dalam cawan petri steril berisi YMA yang selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diamati warna, ukuran, dan bentuknya. Koloni-koloni bakteri dipisahkan dengan ose bulat berdasarkan warna dan bentuk koloni pada media YMA dalam cawan petri. Isolat yang telah murni disimpan pada YMA miring dan isolat murni tersebut dilakukan pewarnaan gram.

2.3. Uji antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode agar yang dimodifikasi modifikasi. Satu ose bakteri asosiasi alga hijau (*chlorophyta*) ditanam dalam 5 mL media cair YMA diinkubasi dalam suhu kamar selama *overnight*. Bakteri uji yang berupa *S. aureus*, *E. coli* dan *P. aeruginosa* ditanam sesuai dengan kerapatan sel 10^5 cfu/mL pada media *Nutrient Broth* (NB), diambil sebanyak 50 μ L untuk di-*spread* pada permukaan agar. Kertas cakram steril diletakkan secara aseptis pada permukaan agar, kemudian 5 μ L kultur *overnight* isolat bakteri asosiasi alga hijau diteteskan pada kertas cakram dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1-3 hari.

Pengamatan dilakukan terhadap zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram dan diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm.

2.4. Analisis molekuler

Isolat yang menunjukkan potensi memiliki zona bening terbesar, kemudian dilakukan identifikasi molekuler. Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode *chelex* (Walsh *et al.*, 1991), kemudian suspensi DNA yang diperoleh dilakukan amplifikasi menggunakan metode PCR (Radjasa *et al.*, 2001). Primer yang digunakan untuk PCR 16S rDNA adalah primer universal 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan primer spesifik eubacteria 1492R (5'-CTGTTTGCTCCCCACGCTTTC-3') (Long and Azam, 2001). Produk reaksi PCR kemudian diamati dengan elektroforesis gel dengan menggunakan konsentrasi agarosa 0,8%. Purifikasi dan Sekuensing DNA dilakukan di Indoseq GATC, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Malang. Sekuens yang diperoleh dianalisis dengan menyelaraskan urutan nukleotida dengan sekuens yang diduga yang terdapat dalam bank gen menggunakan program MEGA, kemudian daerah yang memiliki kesamaan urutan sekuens dianalisis lagi menggunakan penyelarasan yang terdapat dalam fasilitas penyelarasan *Basic Local Allignment Search Tool* (BLAST) untuk menentukan persentase kesamaan pasangan basa dengan isolat referensi yang terdapat di bank gen.

2.5. Uji Aktivitas Biokimia

Uji aktivitas biokimia isolat dilakukan terhadap hidrolisis pati dan uji fermentasi karbohidrat.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

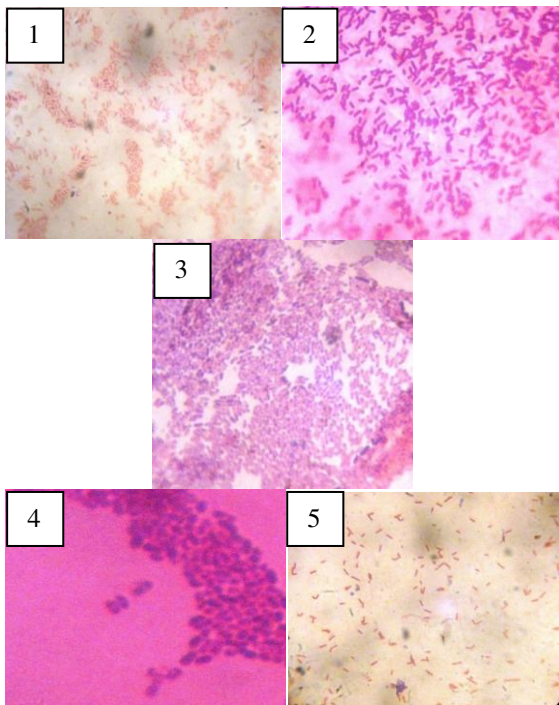
Hasil isolasi bakteri dari ketiga jenis alga hijau tersebut, didapatkan 5 isolat murni yaitu 1 isolat (HM1) dari *H. macroloba*, 3 isolat (CR1, CR2, CR3) dari *C. racemosa*, dan 1 isolat (U1) dari *Ulva* sp. Berdasarkan hasil pengamatan morfologinya didapatkan koloni dengan tepian rata, warna putih, elevasi flat dan memiliki optikal *opaque* pada semua isolat. (Tabel 1).

Tabel 1. Karakteristik morfologi isolat bakteri hasil isolasi

Isolat	Tepian	Warna koloni	Elevasi	Optikal
HM1	rata	Putih	Flat	Opaque
CR1	rata	Putih	Flat	Opaque
CR2	rata	Putih	Flat	Opaque
CR3	rata	Putih	Flat	Opaque
U1	rata	Putih	Flat	Opaque

Keterangan : HM 1 (isolat dari *H. macroloba*), CR (isolat dari *C. racemosa*), U1 (isolat dari *Ulva* sp.)

Hasil pengamatan sel dan pewarnaan Gram menunjukkan bahwa semua isolat berbentuk batang, isolat bakteri dari *H. macroloba* dan *Ulva* sp. merupakan bakteri Gram negatif, sedang isolat bakteri dari *C. racemosa* merupakan bakteri Gram positif. (Gambar 1)



Gambar 1. Pewarnaan Gram isolat bakteri

Keterangan: (1). isolat HM1, (2) isolat CR1, (3) isolat CR2, (4) isolat CR3, (4) isolat U1.

Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambatan pada pertumbuhan bakteri *E. coli*, *S. aureus* dan *P. aeruginosa*. Isolat

bakteri HM1 mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *E. coli* dan *P. aeruginosa* dengan membentuk zona hambatan yaitu sebesar 14,6 mm dan 18,1 mm. Isolat CR1, CR3, dan U1 tidak mampu membentuk zona hambatan pada ketiga jenis bakteri uji. Isolat bakteri CR2 mampu membentuk zona hambatan pada bakteri *P. aeruginosa* sebesar 15,3 mm. Isolat bakteri HM1 diketahui mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif (*E. coli*), namun tidak ada isolat hasil isolasi yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif (*S. aureus*). (Tabel 2).

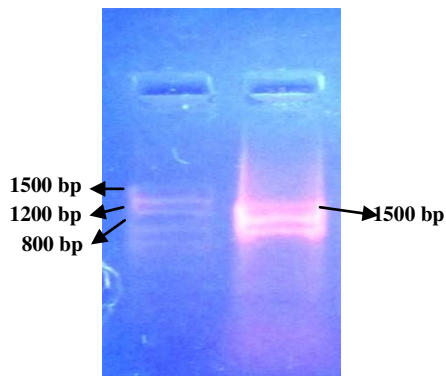
Tabel 2. Aktivitas antibakteri isolat hasil isolasi

Isolat	Diameter zona hambat (mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
HM1	-	14,6	18,1
CR1	-	-	-
CR2	-	-	15,3
CR3	-	-	-
UV1	-	-	-

Radji (2011) menjelaskan bahwa dinding sel bakteri gram positif terdiri atas beberapa lapisan peptidoglikan yang membentuk struktur yang tebal dan kaku serta mengandung substansi dinding sel yang disebut asam teikoat, sedangkan dinding sel bakteri gram negatif terdiri atas satu atau lebih lapisan peptidoglikan yang tipis dan membran di bagian luar lapisan peptidoglikan. Karena hanya mengandung sedikit lapisan peptidoglikan dan tidak mengandung asam teikoat, maka dinding sel bakteri gram negatif lebih rentan terhadap pemberian antibiotik atau bahan antibakteri lainnya. Senyawa antibakteri juga dapat merusak membran sel, Gunawan (2007) menyatakan efek antibakteri dalam merusak membran sel dengan cara bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel bakteri dan bereaksi dengan struktur sterol, sehingga mempengaruhi permeabilitas selektif membran.

Isolat HM1 yang menunjukkan zona hambat terbesar selanjutnya dianalisis secara molekuler untuk diketahui kekerabatannya dengan spesies yang telah diketahui identitasnya. Hasil visualisasi PCR 16S rDNA dapat dilihat pada Gambar 2.

M I



Gambar 2. Visualisasi hasil PCR 16S rDNA isolat HM. Keterangan : M = marker ; I = Isolat HM1

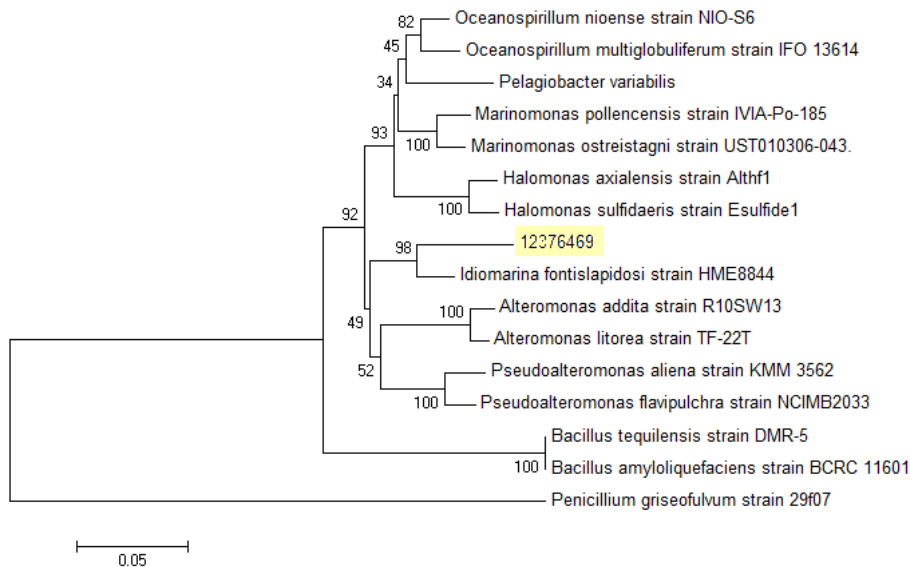
Panjang DNA hasil PCR yang tervisualisasi berukuran ± 1500 bp dengan menggunakan perbandingan dari DNA marker yang berukuran 2000 bp. Ukuran 16S rDNA pada umumnya mencapai 1500 bp. Clarridge (2004) menjelaskan panjang urutan basa gen 16S rDNA adalah 1500-1550 bp. Urutan basa nitrogen hasil sekuensing isolat bakteri HM dapat dilihat pada Gambar 3.

```

TCAACTCGTGATTCCCATTCGAAGATGCCCGCATGAGTCTGAGAGCAGT
GCGACTTTCCAGTGCTAGCGTCTAAATCGCGTAGATATTGACGATCG
AGTGGCGAATGCGGCCACCTGTCTAGACACTGCATCTCTAGGTTCTGA
AAGCATGCGGAGCCAAACAGGATAGATCACTGCTAGTCGACGCCGTAA
CCGCATGTCACTAGTCGTCGGTCCCTAAGGCGTGAGTAGACGCAGC
TAACGCACTAAGTTCGCCCGCTGGGGAGTCAGGGCCGCAAGGGTAA
ACTCAAATGAATTGACGGGGTCCGCCAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCATCCCTTGACATCCAGTGA
ACTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACCACTGAGACAGGTGC
TGCATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTTATCCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAAC
TCTGGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGT
CAAGTCATCATGGCCTTACGGGATGGGTACACACGTGCTACAATGGC
CGGTACAAAGGGCAGCGAACCTCGGAAGTAAGCGAATCTCATAAAG
CGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGG
AATCGTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGCTGCACCAGAA
GTGCTTAGAGTTTGTATGCTCGAGATTGACACTCGGCAGTCTATTG
CAC
    
```

Gambar 3. Urutan basa nitrogen hasil sekuensing isolat HM1. Keterangan: A = adenine, T = timin, G = guanine, C = sitosin

Hasil sekuensing dianalisis dengan membandingkan urutan basa isolat yang berpotensi menghasilkan senyawa antibakteri dengan data yang dimiliki oleh NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Hasil menunjukkan bahwa terdapat kesamaan homologi sebesar 94% terhadap bakteri *Idiomarina fontislapidosi* strain HME8844.



Gambar 4. Pohon filogenetik isolat HM1 (12376469) dengan bakteri-bakteri kerabatnya

Hasil analisis sekuensing dilanjutkan dengan merekonstruksi pohon filogenetik. Pohon filogenetik dibuat dalam bentuk *neighbor joining* dengan beberapa jenis bakteri penghasil antibakteri dan

beberapa genus yang masih berkerabat dekat dengan isolat HM1 (Gambar 4). Nilai *bootstrap* pada percabangan menunjukkan nilai keakuratan percabangan pada pohon filogenetik. Horiike *et al.*

(2009) menyatakan Nilai *bootstrap* 95% atau lebih mempunyai arti bahwa topologi percabangan tersebut sangat akurat, konsisten atau tidak akan berubah walaupun dilakukan dengan metode penyusunan pohon filogenetik lainnya. Nilai *bootstrap* >70% menunjukkan bahwa percabangannya bersifat cukup signifikan dan tetap (Coenye and Vandamme, 2003).

Uji fermentasi terhadap karbohidrat dan hidrolisis pati dari isolat bakteri HM1 dimaksudkan untuk konfirmasi beberapa karakteristik biokimia, khususnya karbohidrat dengan *I. fontislapidosi*. Hasil hidrolisis pati dan fermentasi karbohidrat menunjukkan bahwa isolat HM1 negatif terhadap hidrolisis pati, fermentasi fruktosa, fermentasi arabinosa, dan fermentasi sukrosa.

4. KESIMPULAN

Penelitian ini menyimpulkan bahwa isolat bakteri yang paling potensi menghasilkan senyawa antibakteri diperoleh dari alga *H. macroloba* dan identifikasi molekuler menunjukkan kemiripan sifat dengan bakteri *Idiomarina fontislapidosi* strain HME 8844.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A. (2006). Isolasi dan identifikasi mikroba asosiasi sponge *Axinella* sp. *Jurnal ilmu Pertanian Indonesia*, 11(3), 1-5.
- Burgess, J.G., Boyd, K.G., Armstrong, E., Jiang, Z., Yan, L., Berggren, M., May, U., Pisacane, T., Granmo, A., & Adams, D.R. (2003). Development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling*, 19, 197-205.
- Clarridge, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacterial on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 17, 840-862.
- Coenye, T. & Vandamme, P. (2003). Extracting phylogenetic information from wholegenome sequencing projects: the lactic acid bacteria as a test case. *Microbiology*, 149, 3507-3517.
- Dzeha, T., Jaspars M., & Tabudravu, J. (2003). Clionasterol, a terpenoid from the Kenyan marine gree macroalga *Halimeda macroloba*. *West. Indian Ocean maer. Sci.*, 2, 157-161.
- Gunawan. (2007). *Penapisan awal ekstraksi senyawa bioaktif sebagai antibakteri serta uji toksisitas dan uji minimum inhibitory concentration (MIC) dari karang lunak asal perairan Pulau Panggang, Kepulauan Seribu* Unpublished thesis, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Horiike, T., Miyata, D., Hamada, K., Saruhashi, S., Shinozawa, T., Kumar, S., Chakraborty, R., Komiyama, T., Tateno, Y. (2009). Phylogenetic construction of 17 bacterial phyla by new method and carefully selected orthologs. *Gene*, 429, 59-64.
- Long, R. A., & Azam, F. (2001). Antagonistic Interactions among Marine Pelagic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* p, 67(11), 4975-4983.
- Madigan, J., David, A.S. & David, P.C. (2012). *Biology of Microorganism*, (13th ed). USA: Benjamin Cummings.
- Munn, C.B. (2004). *Marine Microbiology, Ecology and Application*. Garland Science BIOS Science Publishers.
- Murniasih, T. & Rasyid, A. (2010). Potensi bakteri yang berasosiasi dengan spons asal Barang Lompo (Makassar) sebagai sumber bahan antibakteri. *Oseana*, 36(3), 281-292.
- Radjasa, O.K., Urakawa, H., K Kita-Tsukamoto, & Ohwada, K. (2001). Characterization of psychrotrophic bacteria in the surface and deep-sea waters from northwestern Pacific Ocean based on 16S ribosomal DNA approach. *Mar. Biotechnol*, 3, 454- 462.
- Radji, M. . (2011). *Rekayasa Genetika; Pengantar untuk Profesi Kesehatan*. Jakarta: Sagung Seto.
- Ravikumar, S., Thajuddin, N., Suganthi, P., Jacob, S & Vinodkumar, T. (2010). Bioactive Potential of seagrass bacteria against Human bacterial Pathogens. *Journal of Environmental Biology*. 387-389.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A. & Higuchi, R., (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10, 506-513.
- Watermann, B. (1999). Alternative antifoulant techniques present and future. *LimnoMar*: 1-6

