

Isolasi Bakteri Symbion Moluska Penghasil Senyawa Antibakteri Multi Drug resistant (MDR)

Delianis Pringgenies dan Mijil Ciptaning Dananjoyo

Abstrak

Resistensi antibiotik merupakan kemampuan dari bakteri dalam menahan efek dari antibiotik. Dilaporkan bahwa terdapat jenis bakteri patogen pada manusia yang telah mengalami resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik. Resistensi antibiotik tersebut menjadi suatu permasalahan dalam dunia kesehatan. Untuk mengatasi permasalahan tersebut, maka perlu dilakukan pencarian senyawa antibiotik baru yang lebih efektif dan efisien dalam mengatasi permasalahan bakteri *Multi Drug Resistance* (MDR). Metabolit sekunder yang diproduksi oleh invertebrata laut dan mikroorganisme simbiosis, mempunyai prospek sebagai antibiotik. Mikroorganisme simbiosis diduga mampu menghasilkan metabolit sekunder seperti organisme inangnya. Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan isolasi dan identifikasi bakteri simbiosis gastropoda yang memiliki kemampuan menghasilkan senyawa antibakteri *Multi Drug Resistant* (MDR).

Sampel moluska dikoleksi dari perairan Kepulauan Ternat. Selanjutnya dilakukan isolasi bakteri simbiosis dari sampel moluska, skrining bakteri yang potensi sebagai pda bakteri Multi Drug resisten (MDR), uji anti bakteri, uji sensitifitas anti bakteri, ekstraksi DNA bakteri. Aplikasi DNA amplidengan metode PCR, sequencing DNA. Hasil dari sequencing 16S r-DNA dianalisis dengan program GENETYX.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 17 isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari gastropoda *Stramonita armigera*. Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan isolat TSA 8.7 mampu menghambat 3 bakteri uji yaitu *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* dan *Enterobacter* sp. Hasil analisis molekuler menunjukkan isolat TSA 8.7 memiliki kekerabatan dengan bakteri *Vibrio* sp. Strain JZDN1 dengan homologi sebesar 98 %. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa bakteri simbiosis gastropoda *Stramonita armigera* ternyata memiliki senyawa antibakteri terhadap bakteri *strain Multi Drug Resistant* (MDR) dan didapatkan 11 jenis isolat bakteri simbiosis gastropoda *Stramonita armigera* yang memiliki aktivitas antibakteri MDR.

Kata kunci : Bakteri Symbion, Gastropoda, Antibakteri, *Multi Drug Resistant*

Abstract

Antibiotic resistance is an ability of bacteria to hold the antibiotic effect. It was reported that there is a human-pathogen bacteria that resistance to one or more classes of antibiotic. It was become a problems on medical world. To solve those problems, it is necessary to search the new antibiotic compounds that more effective and efficient to solve the problem of *Multi Drug Resistance* (MDR). The secondary metabolite-producing marine invertebrates and symbiont microorganisms, have prospect as an antibiotic. The symbiont microorganisms may produce the secondary metabolite similar to their host.

The purposes of the reseach were to isolate and characterize of gastropods symbiont bacteria that capable of producing Antibacterial MDR (*Multi Drugs Resistant*) Compound.

Sample of Molusc were collected from Ternate (Molucas) islands. Isolation of symbiotic bacteria, screening for bacteria which producing secondary metabolites as anti-MDR bacteria, antibacterial test, isolation of clinical pathogenic bacteria of MDR.); conducting anti-bacterial sensitivity test, sensitivity test for antibacterial, DNA exctraction, DNA amplification based on PCR method, DNA sequencing. Result of 16S r-DNA sequence was then analyzed and edited using GENETYX program and followed by 16S rDNA sequence analysis.

The result showed that 17 strains were isolated from gastropods *Stramonita armigera*. Antibacterial assays showed that TSA 8.7 isolate have ability to inhibit *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* dan *Enterobacter* sp. the molecular analyses showed that isolate TSA 8.7 closed by related to *Vibrio* sp. Strain JZDN1, with 98 % of homology. Based on this experimental result, it could be concluded that gastropods-symbiont bacterium *Stramonita armigera* capable of producing antibacterial compound against strain Multi Drug Resistant (MDR). There is 11 isolates of gastropods-symbiont bacteria *Stramonita armigera* that have an antibacterial MDR activity.

Key words: Symbiont Bacteria, Gastropods, Antibacterial, Multi Drug Resistant

PENDAHULUAN

Bakteri *Multi Drug Resistant* (MDR) saat ini telah menjadi salah satu permasalahan dalam dunia kesehatan yang sangat serius. Untuk mengatasi permasalahan tersebut, perlu dilakukan pencarian senyawa antibiotik baru yang lebih efektif dan efisien dalam mengatasi permasalahan bakteri *Multi Drug Resistant* (MDR). Telah dilakukan eksplorasi senyawa antibiotik yang berasal dari daratan maupun lautan guna memenuhi kebutuhan akan sumber antibiotik yang baru. Berbagai pendekatan telah dilakukan untuk mendapatkan senyawa antibiotik yang baru, salah satunya adalah dengan mencari senyawa bioaktif dari mikroorganisme yang bersimbiosis dengan invertebrata laut.

Gastropoda merupakan salah satu kelas dari filum moluska yang memiliki kemampuan menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai senyawa antibiotik. Gastropoda jenis *Stramonita* dilaporkan memiliki senyawa bioaktif Bromoindirubins yang mempunyai aktivitas sebagai antikanker serta memiliki aktivitas antibakteri (Westley dan Benkendorff, 2008). Salah satu alternatif untuk mendapatkan senyawa bioaktif dari gastropoda ialah dengan mengisolasi bakteri simbiosis dari gastropoda tersebut. Oleh karena informasi mengenai bakteri yang bersimbiosis terhadap gastropoda *Stramonita* sp. belum banyak diketahui, maka perlu dilakukan sebuah penelitian mengenai jenis bakteri yang bersimbiosis dengan gastropoda *Stramonita* sp. yang memiliki aktivitas antibakteri *Multi Drug Resistant* (MDR).

Berdasarkan hal tersebut, maka tujuan penelitian adalah mengisolasi dan menyeleksi bakteri yang bersimbiosis dengan gastropoda yang mampu menghasilkan senyawa antibakteri terhadap bakteri MDR (*Multi Drug Resistant*). Selanjutnya adalah mengidentifikasi bakteri yang memiliki senyawa antibakteri MDR dengan menggunakan PCR 16S rDNA.

METODA

Identifikasi Sampel Gastropoda

Identifikasi sampel gastropoda menggunakan buku panduan identifikasi spesies yang diterbitkan oleh FAO “*THE LIVING MARINE RESOURCES OF*

THE WESTERN CENTRAL PACIFIC Volume 1. Seaweeds, corals, bivalves and gastropods” oleh Carpenter dan Niem (1998), serta buku *Recent & Fossil Indonesian Shell* karangan Bunjamin (2005).

Pengukuran cangkang gastropoda dilakukan berdasarkan kaidah pengukuran cangkang menurut Carpenter dan Niem (1998), dimana untuk mengukur panjang cangkang dilakukan pengukuran dari bagian ujung anterior cangkang hingga bagian ujung posterior cangkang, kemudian untuk pengukuran lebar dilakukan pengukuran dari bagian pojok kanan dari cangkang hingga bagian pojok kiri dari cangkang.

Purifikasi bakteri

Purifikasi bakteri dilakukan dengan metode goresan (*streak*). Koloni-koloni bakteri dipisahkan dengan jarum ose berdasarkan perbedaan warna dan bentuk koloni pada media zobel dalam cawan petri. Pemurnian (purifikasi) isolat bakteri dilakukan secara berulang-ulang sehingga didapatkan isolat yang benar-benar murni. Isolat murni yang diperoleh disimpan pada media agar miring (Taslihan, 2001).

Screening isolat bakteri gastropoda

Kultur bakteri dilakukan dengan memasukkan satu ose biakan bakteri dari agar miring ke dalam tabung reaksi yang berisi media Zobell 2216E cair sebanyak 5 ml. Kemudian *dishaker* agar bakteri tersuspensi pada media dan diinkubasi pada suhu kamar. Indikasi bahwa bakteri tersebut telah tumbuh ialah dengan berubahnya media yang menjadi keruh.

Uji kualitatif antibakteri menggunakan metode *overlay* (McKillip, 2001). Beberapa isolat bakteri simbion gastropoda diinokulasi secara dot method ke permukaan media Zobell 2216E dalam satu cawan petri kemudian diinkubasikan selama 4 x 24 jam pada suhu ruangan. Bakteri uji dikultur pada media Zobell 2216E cair dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruangan. Sebanyak 1% kultur (dari volume total soft Agar) dari setiap bakteri dicampur dengan soft agar yang kemudian akan dituangkan pada media yang telah dinokulasi isolat bakteri simbion gastropoda sebelumnya dan inkubasikan pada suhu ruang selama 2 x 24

jam. Aktivitas Anti-bakteri akan ditentukan oleh adanya zona hambatan yang terbentuk di sekeliling isolat bakteri simbion gastropoda.

Uji kuantitatif antibakteri

Uji kuantitatif dilakukan menggunakan metode difusi agar menurut Kirby-Bauer (Volk and Wheller, 1999). Sebanyak 100 µl kultur cair bakteri uji yang telah diinkubasi selama 24 jam diteteskan pada media Zobell 2216E dan diratakan menggunakan *L glass*. Diamkan selama beberapa menit agar bakteri uji meresap ke dalam media. *Paper disk* steril diletakkan pada permukaan media dengan agak ditekan agar tidak lepas. Peletakkan *paper disk* ini dilakukan secara aseptis dengan menggunakan pinset steril. Teteskan kultur cair isolat bakteri gastropoda sebanyak 30 µl yang telah diinkubasi selama 5 x 24 jam pada *paper disk* kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 2 x 24 jam. Apabila terbentuk zona hambat, maka zona hambat tersebut diukur menggunakan jangka sorong.

Ekstraksi DNA

Ambil isolat koloni bakteri dan larutkan dalam 1 ml air steril dalam micro centrifuge tube yang bervolume 1,5 ml . Sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 10.000-12.000 rpm, kemudian buang supernatan yang diperoleh. Tambahkan 200 µl *matriks instagene* kepelet (endapan bakteri), kemudian di *vortex* dan inkubasi pada suhu 56 °C dengan menggunakan *heatblock* selama 30 menit, *vortex* kembali pada kecepatan tinggi selama 10 detik, letakkan tube pada suhu 100 °C pada *heatblock* selama 8 menit, selanjutnya *vortex* pada kecepatan tinggi selama 10 detik, sentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 3 menit. Gunakan 20 µl hasil supernatant (larutan genom DNA) per 50 µl reaksi per. kembali metode preparasi DNA.

Analisis PCR 16S rDNA

Primer yang digunakan pada amplifikasi DNA menggunakan PCR 16S rDNA yaitu Forward (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') posisi 8-27 dan 1492 Reverse (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Sedangkan perlakuan temperatur yang digunakan adalah sebagai berikut : denaturasi pada 94 °C selama

2 menit, kemudian 30 siklus (*annealing* pada 50 °C selama 40 detik, ekstensi pada 72 °C selama 1 menit dan denaturasi kembali pada 94 °C selama 40 detik), serta 42 °C selama 1 menit, 72 °C selama 5 menit dan terakhir 4 °C ~.

Campuran bahan yang digunakan ialah MgCl₂ 25mM (5 µl), dNTP 2,5 mM (4 µl), 10x buffer (5 µl), LA Taq (0,25 µl), ddH₂O (26,75 µl), template (5 µl), primer 8F (2 µl), primer 1492R (2 µl) sehingga total volume sebesar 50 µl, kemudian semua bahan dicampurkan kedalam tabung PCR.

Produk PCR kemudian dielektroforesis dengan menggunakan gel agarose 0,8 %. Pembuatan gel agarose dilakukan dengan cara memasukkan 0,32 gr agarose kedalam TAE 1x sebanyak 40 ml, kemudian panaskan hingga larut kemudian didinginkan. Tambahkan *CyBr Safe DNA* gel stain sebanyak 1/1000 volume gel, setelah itu masukkan kedalam cetakan gel hingga padat. Gel kemudian dimasukkan kedalam alat elektroforesis hingga terendam larutan TAE1x, setelah itu masukkan hasil PCR yang telah ditambahkan loading dye (pemberat DNA) kedalam sumur gel kemudian dimasukkan pula ladder (penngaris DNA) pada sumur gel pertama, elektroforesis dilakukan selama kurang lebih 30 menit pada arus 100 V. Setelah selesai elektroforesis kemudian dilakukan visualisasi untuk mengamati band DNA, band DNA yang terbentuk kemudian dipotong dan disimpan dalam mikrocentrifuge tube, lalu simpan pada suhu -20 °C.

Purifikasi Produk PCR 16S rDNA

Setelah dilakukan elektroforesis dan diperoleh pita DNA hasil PCR kemudian pita DNA tersebut dipurifikasi dengan cara menambahkan 400 µl DF *Buffer* kedalam potongan gel dalam tube, kemudian dipanaskan pada *heatblock* pada suhu 60 °C hingga larut selama kurang lebih 15-20 menit, setelah larut kemudian dimasukkan kedalam DF column lalu sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 13000 rpm. Buang supernatan yang diperoleh, lalu tambahkan *wash buffer* sebanyak 750 µl lalu disentrifugasi pada 13000 rpm selama 1 menit, supernatan yang diperoleh dibuang, tempatkan DF column ketempat semula, sentrifuse dalam keadaan kosong selama 2 menit pada 13000 rpm. Pindahkan DF column kedalam tube baru, tambahkan *elution buffer* 20 µl kedalam DF column lalu inkubasi pada suhu 60 °C selama 3 menit. Sentrifugasi pada 13000 rpm

selama 2 menit, supernatan yang diperoleh ialah DNA, simpan DNA pada suhu - 20 °C.

Sekuensing DNA

Sebelum dilakukan Sekuensing DNA terlebih dahulu dilakukan *PCR Cycle Sequence*, pada *PCR Cycle Sequence* ialah DNA hasil purifikasi yang telah diperoleh pada PCR sebelumnya ditambahkan dengan primer 765R dan 1114R. Hasil *PCR Cycle Sequence* kemudian dipurifikasi dengan menambahkan ddH₂O equal volume (20 µl), EDTA 125 mM (4 µl), NaOAc 3M (4 µl), etanol absolut 100 % kemudian dicampurkan hingga larut, bungkus dengan alumunium foil dan diinkubasi selama 15 menit, kemudian sentrifuse selama 30 menit pada kecepatan 3000 G, buang supernatan yang diperoleh dan ditambahkan alkohol 70% sebanyak 150 µl, sentrifuse selama 15 menit pada 3000 G, buang supernatan yang diperoleh kemudian di flash dan dibersihkan dengan tisu. Hasil tersebut dimasukkan kedalam desicator selama 7 menit kemudian dilakukan dilusi dengan menambahkan 15 µl nukleus free water lalu di flash. Panaskan pada heatblock selama 8 menit pada suhu 52 °C kemudian di flash kembali selama 20 menit pada 6000 G. Hasil Purifikasi Produk *PCR Cycle Sequence* kemudian dimasukkan kedalam mesin sequenser (*Automatic Sekuenser ABI 3130 XL Genetic Analyzer Applied Biosystem*) dan secara otomatis hasil sekuen akan langsung ditransferkan kedalam komputer.

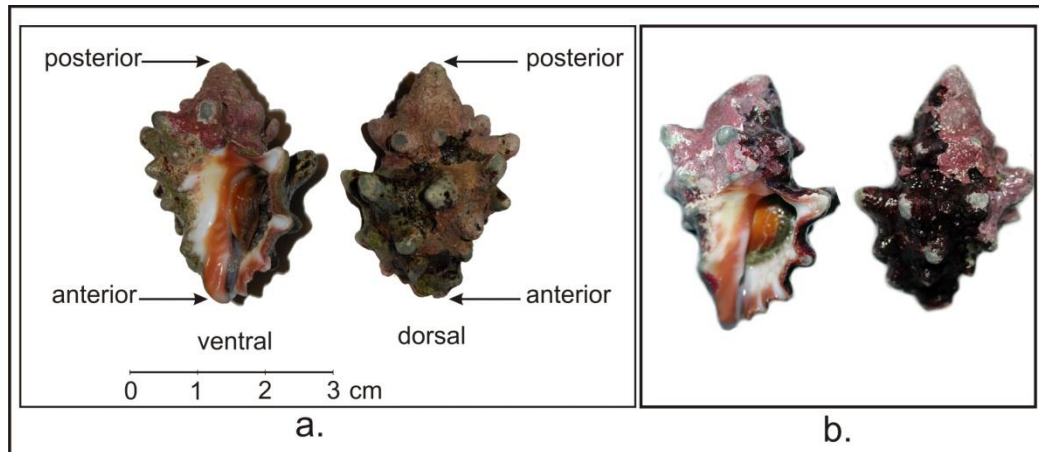
Analisis Sekuen DNA

Hasil sekuen selanjutnya dibandingkan dengan sekuen DNA pada DNA *database Gen Bank*. Penelusuran dilakukan dengan sistem internet, yaitu melalui sistem pelacakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Atschul *et al.*, 1997) pada *National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health, USA* untuk mengetahui % homologi dan untuk mengidentifikasi isolat.

HASIL

Identifikasi Gastropoda *Stramonita* sp.

Sampel gastropoda *Stramonita* sp. seperti yang tertera pada Gambar 1.



Gambar 1. *Stramonita* sp. (Hasil Dokumentasi Penelitian) (a); *Stramonita armigera* (LINK, 1807) (<http://www.botany.hawaii.edu>) (b)

Sampel gastropoda *Stramonita* sp. yang dikoleksi dari perairan ternate mempunyai ciri-ciri sebagai berikut; memiliki cangkang keras dengan tekstur yang kasar, warna cangkang hijau muda dan berwarna ungu, ukuran cangkang kecil dengan panjang 4,6 cm dan lebar 2,4 cm, terdapat duri-duri tumpul berukuran besar yang mengelilingi cangkang secara tidak teratur, bentuk cangkang pada bagian posterior mengerucut. Berdasarkan ciri-ciri yang disebutkan menunjukkan bahwa nama spesies dari gastropoda tersebut ialah *Stramonita armigera* (Link, 1807).

Isolasi Bakteri Symbion Gastropoda

Jumlah isolat bakteri yang diperoleh dari gastropoda *Stramonita armigera* ialah berjumlah 17 isolat bakteri, dimana isolat tersebut memiliki sifat koloni yang dibedakan berdasarkan; bentuk, dimana bentuk dari koloni yang ditemukan ialah tidak teratur, bulat, berbenang serta titik-titik; tepi, dimana tepi dari koloni yang ditemukan ialah berombak, berbenang, utuh serta keriting; permukaan, permukaan dari koloni yang ditemukan ialah rata dan serupa kawah; dan warna, dimana warna dari koloni yang ditemukan ialah putih, kuning, putih keruh serta putih transparan. Sifat dari tiap koloni tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel. 1: Data Isolat Bakteri *Stramonita armigera*

No	Kode Isolat	Sifat Koloni			
		Bentuk	Tepi	Permukaan	Warna
1	TSA 8.1	Tak teratur	Berombak	Serupa Kawah	Putih Kemerahan
2	TSA 8.2	Tak teratur	Berombak	Rata	Putih Keruh
3	TSA 8.3	Tak teratur	Berbenang	Rata	Putih Transparan
4	TSA 8.4	Bulat	Berombak	Rata	Putih Transparan
5	TSA 8.5	Bulat	Utuh	Rata	Putih Transparan
6	TSA 8.6	Bulat	Utuh	Rata	Putih Keruh
7	TSA 8.7	Berbenang	Berbenang	Serupa Kawah	Putih Keruh
8	TSA 8.8	Titik-titik	Keriting	Rata	Kuning
9	TSA 8.9	Tak Teratur	Keriting	Rata	Putih Keruh
10	TSA 8.10	Bulat	Utuh	Rata	Putih Keruh
11	TSA 8.11	Bulat	Utuh	Rata	Putih Keruh
12	TSA 8.12	Bulat	Keriting	Rata	Putih Keruh
13	TSA 8.13	Bulat	Utuh	Rata	Putih Keruh
14	TSA 8.14	Tak Teratur	Berombak	Rata	Kuning
15	TSA 8.15	Bulat	Utuh	Rata	Kuning
16	TSA 8.16	Bulat	Utuh	Rata	Putih
17	TSA 8.17	Bulat	Utuh	Rata	Putih

Uji Kualitatif Antibakteri MDR (*Multi Drug Resistant*)

Uji kualitatif dilakukan dengan metode *overlay*, bakteri simbion gastropoda ditanam sebanyak 10-12 isolat bakteri dalam 1 cawan petri yang diujikan terhadap strain bakteri MDR jenis *Klebsiella* sp., *E. coli*, *Coagulase Negatif Staphylococcus* (CNS), *Enterobacter* 5, *Enterobacter* 10 dan *Pseudomonas* sp. Berdasarkan hasil uji kualitatif Antibakteri MDR memperlihatkan bahwa dari 17 isolat bakteri simbion gastropoda *Stramonita armigera* yang didapatkan, ternyata hanya 11 isolat bakteri simbion gastropoda yang memiliki potensi menghasilkan senyawa antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri MDR secara kualitatif yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel. 2. Hasil Uji Kualitatif antibakteri MDR Bakteri *Stramonita armigera* Terhadap Bakteri MDR

Kode Isolat	Bakteri Uji MDR					
	Klebsiella	Pseudomonas	E.Coli	CNS	Enterobacter 5	Enterobacter 10
TSA 8.1	-	+	-	-	-	+
TSA 8.2	-	+	-	-	+	+
TSA 8.3	-	+	-	-	+	-
TSA 8.4	-	+	-	-	+	+
TSA 8.5	-	+	-	-	+	+
TSA 8.6	-	-	-	-	-	+
TSA 8.7	-	+	+		+	-
TSA 8.8	-	-	-	+	-	-
TSA 8.9	-	-	-	-	-	+
TSA 8.10	-	-	-	-	-	-
TSA 8.11	-	-	-	-	-	-
TSA 8.12	-	-	-	-	-	-
TSA 8.13	-	-	-	-	-	-
TSA 8.14	-	+	+	-	-	-
TSA 8.15	-	+	+	-	-	-
TSA 8.16	-	-	-	-	-	-
TSA 8.17	-	-	-	-	-	-
jumlah	0	8	3	1	5	6

Keterangan : + = mampu menghambat
 - = tidak mampu menghambat

Uji Kuantitatif Antibakteri MDR (*Multi Drug Resistant*)

Uji kuantitatif dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar berdasarkan prinsip Kirby-Bauer dan menggunakan kertas cakram yang berdiameter 8 mm. Adapun hasil uji kuantitatif Antibakteri MDR disajikan dalam Tabel 3 :

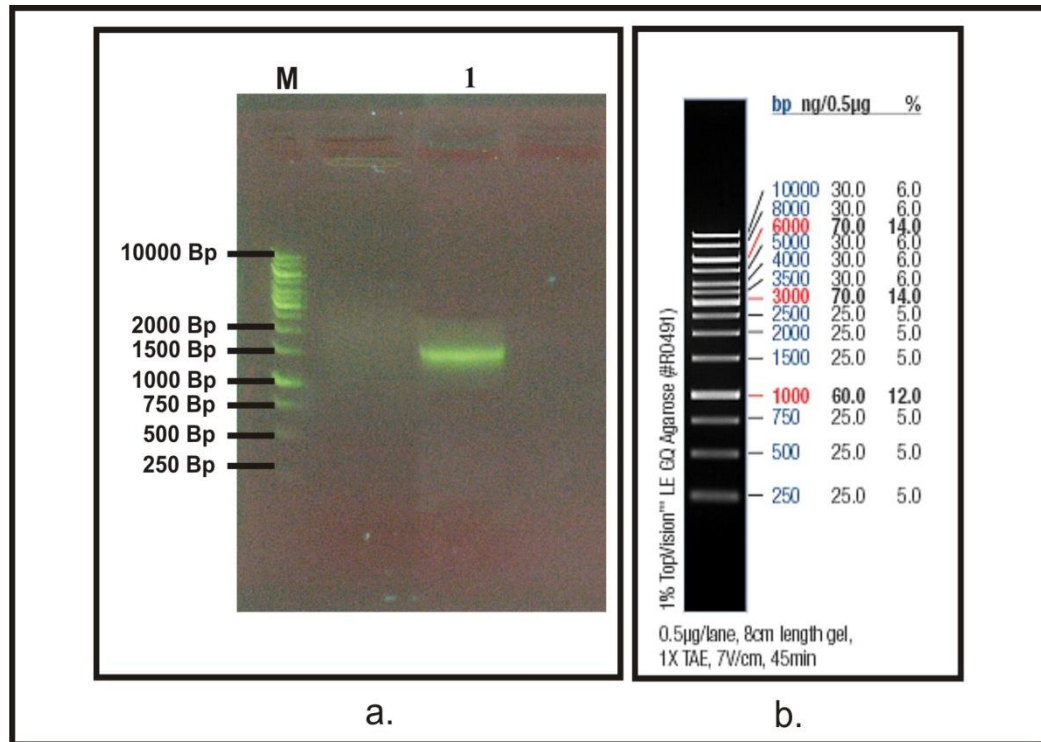
Tabel 3. Hasil Uji Kuantitatif antibakteri MDR Bakteri *Stramonita armigera* terhadap Bakteri MDR

Kode Isolat	Diameter zona hambat (mm)					
	Klebsiella	Pseudomonas	E.Coli	CNS	Enterobacter 5	Enterobacter 10
TSA 8.1	-	9.23	-	-	-	8.66
TSA 8.2	-	9.63	-	-	9.95	8.56
TSA 8.3	-	8.63	-	-	9.22	-
TSA 8.4	-	8.90	-	-	9.53	8.62
TSA 8.5	-	10.29	-	-	9.59	8.78
TSA 8.6	-	-	-	-	-	8.88
TSA 8.7	-	11.59	9.01	-	9.71	-
TSA 8.8	-	-	-	12.91	-	-
TSA 8.9	-	-	-	-	-	8.77
TSA 8.10	-	-	-	-	-	-
TSA 8.11	-	-	-	-	-	-
TSA 8.12	-	-	-	-	-	-
TSA 8.13	-	-	-	-	-	-
TSA 8.14	-	13.53	8.64	-	-	-
TSA 8.15	-	10.95	8.82	-	-	-
TSA 8.16	-	-	-	-	-	-
TSA 8.17	-	-	-	-	-	-

Berdasarkan kemampuan daya hambat terhadap bakteri uji serta besarnya zona hambatan yang dibentuk maka terpilihlah satu isolat terbaik untuk uji lanjutan, yaitu isolat TSA 8.7.

Amplifikasi DNA

Hasil amplifikasi DNA dari isolat TSA 8.7 dapat dilihat pada Gambar 2 . Gambar tersebut menunjukkan bahwa isolat TSA 8.7 menghasilkan *single band* (pita tunggal) dengan ukuran sekitar 1500 bp (*base pair*) sesuai dengan pembandingan menggunakan *marker* (penanda) DNA.



Gambar 2. Hasil Amplifikasi Gen 16S rDNA TSA 8.7 (M: DNA Marker, 1: Isolat TSA 8.7) (a); DNA Marker (b).

Analisa Filogenetik Molekuler

Hasil sekuen gen 16S rDNA dari isolat bakteri gastropoda terpilih dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Sekuen dari Isolat Bakteri Simbion Gastropoda

Isolat	Sekuen
TSA 8.7	AGGGGTCGTATCTGGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGT ATTCCTTCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGAAA TTCTACCCCCCTCTACAGTACTCTAGTCTGCCAGTTTCAAAT GCTATTCCGAGGTTGAGCCCCGGGCTTTCACATCTGACTTA ACAAACCACCTGCATGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATT AACGCTCGCACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGA GTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTCGCTAACGTCAAATAAAG

Hasil penelusuran homologi sekuen 16S rDNA isolat TSA 8.7 dengan sekuen *DNA database Gene Bank* menggunakan sistem BLAST dapat dilihat pada Gambar 3. Sedangkan homologi isolat bakteri dengan bakteri dari *database Gene Bank* dapat dilihat pada Tabel 5.

```

>|gb|DQ658982.1| Vibrio sp. JZDN1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=978

Score = 508 bits (275), Expect = 6e-142
Identities = 280/282 (99%), Gaps = 2/282 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query  5      GTC-GTATCTGGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCCTTCAGATCTCTACGCAT  63
      ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 397      GTCAGTACT-GTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCCTTCAGATCTCTACGCAT  339

Query  64      TTCACCGCTACACCTGAAATTCTACCCCCCTCTACAGTACTCTAGTCTGCCAGTTTCAA  123
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 338      TTCACCGCTACACCTGAAATTCTACCCCCCTCTACAGTACTCTAGTCTGCCAGTTTCAA  279

Query  124     TGCTATTCCGAGGTTGAGCCCGGGCTTTCACATCTGACTTAACAAACCACCTGCATGCG  183
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 278     TGCTATTCCGAGGTTGAGCCCGGGCTTTCACATCTGACTTAACAAACCACCTGCATGCG  219

Query  184     CTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTCGCACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCA  243
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 218     CTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTCGCACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCA  159

Query  244     CGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTCGCTAACGTCAAATAAA  285
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 158     CGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTCGCTAACGTCAAATAAA  117
    
```

Gambar 3. Hasil Penelusuran Homologi Sekuen 16S rDNA Isolat TSA 8.7 dengan Sekuen *DNA Database Gene Bank* Menggunakan Sistem BLAST.

Tabel 6. Homologi BLAST dari Isolat Bakteri Symbion Gastropoda

No.	Isolat	Kemiripan relatif	Homologi (%)	Nomor akses
1	TSA 8.7	<i>Vibrio</i> sp. JZDN1	98	DQ658982.1

Nilai kekerabatan hubungan antara isolat TSA 8.7 dengan sekuen pada data base yang sangat tinggi (> 95%) menunjukkan bahwa paling tidak identifikasi molekuler ini mendekati kebenaran pada tingkat genus.

cangkang relatif kecil (dengan panjang maksimum mencapai 9 cm), bentuk cangkang selalu melebar pada daerah yang menuju anterior dan bagian posterior cangkang mengerucut, tubuh berulir dengan duri tumpul berukuran besar (berbentuk bongol kerucut) yang mengelilingi cangkang secara tidak teratur, gastropoda dengan ciri tersebut termasuk kedalam famili Muricidae, genus *Stramonita* dengan nama spesies *Stramonita armigera*.

Kelompok muricidae memiliki karakteristik bentuk cangkang yang bervariasi, secara umum puncak cangkang menjulang dan memiliki ukiran yang keras menyerupai bukit spiral dan biasanya terdapat *axial varices* (berjumlah 3 atau lebih pada tiap lingkaran cangkang), terdapat duri serupa tulang yang keras, tidak terdapat *Periostracum*, celah bervariasi, berbentuk oval, adanya *siphonal canal* pada bagian anterior, bagian luar mulut cangkang mengalami dentikulasi dibagian dalam, operkulum seperti tanduk tipis yang memiliki inti yang dekat dengan bagian ujung anterior atau pada bagian tengah dari luar garis tepi. Untuk genus *Stramonita* sendiri dimana genus tersebut memiliki karakteristik yaitu cangkang yang relatif kecil (dengan panjang mencapai 9 cm), *siphonal canal* yang dimiliki pendek, terdapat lekukan kasar pada bagian pinggir anterior serta tubuh berulir dengan deretan berpilin dari duri-kokoh kokoh berbentuk kerucut. Genus *Stramonita* memiliki beberapa jenis spesies dimana tiap spesies tersebut memiliki karakteristik tersendiri, berdasarkan hasil identifikasi menunjukkan bahwa sampel gastropoda yang digunakan ialah jenis *Stramonita armigera* dimana ia mempunyai ciri khusus yang tidak dimiliki oleh jenis *stramonita* yang lain yaitu adanya duri-duri tumpul dengan ukuran sangat besar pada cangkangnya selain itu *Stramonita armigera* ditemukan pada daerah terumbu karang serta perairan dangkal dengan persebaran pada daerah barat indo-pasifik, utara dari Jepang dan Hawaii dan selatan dari Queensland dan New Caledonia. Dharma (2005) menambahkan jenis *Stramonita armigera* (Link 1807) memiliki panjang 55-90 mm dengan daerah persebaran di daerah Indonesia timur.

Terdapat beberapa jenis spesies *Stramonita* yang memiliki kemiripan dengan jenis *Stramonita armigera*, diantaranya ialah jenis *Stramonita alouina* dan *Stramonita acuelata*, dimana jenis *Stramonita alouina* memiliki ciri-ciri yang hampir sama dengan *Stramonita armigera* namun yang membedakannya ialah

duri yang dimilikinya sangatlah kecil serta ukuran cangkangnya yang sedikit lebih besar dibandingkan dengan *Stramonita armigera*, *Stramonita alouina* pada umumnya ditemukan pada daerah bebatuan pada perairan dangkal dimana daerah penyebarannya ialah indo-pasifik barat, dari timur dan afrika selatan hingga melanesia, utara jepang, dan selatan hingga utara New South Wales. Sedangkan jika dibandingkan dengan jenis *Stramonita acuelata*, hanya terdapat sedikit perbedaan dibandingkan dengan jenis *Stramonita armigera* yaitu pada bentuk durinya yang lancip serta kontur cangkangnya yang sedikit lebih halus dibandingkan *Stramonita armigera*, selain itu habitat yang dimilikinya keduanya juga sama, kecuali daerah persebarannya yaitu indo-pasifik barat, dari madagaskar hingga timur Polynesia, utara taiwan dan selatan Queensland (Carpenter dan Niem, 1998).

Bakteri hasil isolasi dari gastropoda *Stramonita armigera* memiliki bentuk, tekstur dan warna koloni yang berbeda dan didapatkan sejumlah 17 isolat bakteri simbion. Menurut Dwidjoseputro (1988) bentuk tubuh bakteri dipengaruhi keadaan medium dan usia, apabila bakteri ditumbuhkan dalam sebuah medium padat, maka akan terbentuk suatu koloni bakteri. Perbedaan dari bentuk, tekstur serta warna koloni dari bakteri simbion yang diisolasi menunjukkan bahwa terdapat suatu keanekaragaman jenis bakteri yang bersimbiosis terhadap gastropoda *Stramonita armigera* tersebut. Perbedaan morfologi dari koloni tersebut serta jumlah koloni dari isolat bakteri yang terbentuk menandakan bahwa terdapat beberapa jenis spesies bakteri yang hidup bersimbiosis pada gastropoda *Stramonita armigera*. Waluyo (2007) menyatakan bahwa bentuk koloni berbeda-beda bagi tiap spesies, dimana bentuk tersebut merupakan ciri khas bagi suatu spesies tertentu. Brock (1991) menambahkan bahwa koloni bakteri merupakan bentuk bakteri yang tampak mata serta memiliki bentuk serta warna yang berbeda. Parameter lingkungan yang mempengaruhi kelimpahan bakteri antara lain ialah daerah isolasi yang spesifik dan biasanya meliputi tinggi rendahnya temperatur, kenaikan tekanan dan pada beberapa kasus salinitas juga sangat berpengaruh (Leone *et al.*, 2007).

Berdasarkan uji kualitatif (antibakteri MDR) diperoleh 11 isolat bakteri simbion yang mampu menghambat aktivitas bakteri uji, isolat-isolat tersebut ialah

isolat TSA 8.1, TSA 8.2, TSA 8.3, TSA 8.4, TSA 8.5, TSA 8.6, TSA 8.7, TSA 8.8, TSA 8.9, TSA 8.14 dan TSA 8.15. Aktivitas antibakteri MDR diperlihatkan dengan terbentuknya zona hambat yang tampak sebagai daerah bening yang berada disekitar *paper disk*. Hasil ini membuktikan bahwa isolat-isolat bakteri tersebut memiliki potensi menghasilkan senyawa antibakteri dengan menghambat pertumbuhan bakteri uji. Penghambatan pertumbuhan bakteri uji tersebut dapat terjadi dikarenakan beberapa faktor, antara lain ialah adanya persaingan sebagai usaha dalam mendapatkan ruang dan nutrisi antara isolat bakteri simbion dengan bakteri uji serta adanya sistem pengeluaran metabolit sekunder yang dikeluarkan oleh isolat bakteri simbion. Dwidjoseputro (1988) menyatakan bahwa apabila dua spesies yang bersaing ditumbuhkan pada tempat yang sama, maka spesies yang satu akan menghasilkan suatu senyawa yang dapat meracuni spesies yang lain, sehingga pertumbuhan spesies tersebut akan terganggu. Bakteri akan mengembangkan mekanisme pertahanan diri untuk menghadapi sesuatu yang mengancam kelangsungan hidupnya. Salah satu ancaman tersebut ialah perubahan kondisi lingkungan akibat kehadiran zat/senyawa asing (Conseption *et al.*, 1994 dalam Sabdono *et al.*, 2006).

Kemampuan dari tiap-tiap isolat bakteri simbion dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji berbeda-beda (Tabel 3). Diketahui bahwa terdapat 4 isolat bakteri simbion yang mampu menghambat 3 bakteri uji yaitu, TSA 8.2, TSA 8.4, TSA 8.5 dan TSA 8.7; terdapat 4 isolat bakteri simbion yang mampu menghambat 2 bakteri uji yaitu, TSA 8.1, TSA 8.3, TSA 8.14 dan TSA 8.15; dan terdapat 3 isolat bakteri simbion yang mampu menghambat 1 bakteri uji yaitu, TSA 8.6, TSA 8.8 dan TSA 8.9. Kemampuan suatu isolat bakteri simbion dalam menghambat lebih dari satu jenis bakteri uji dapat terjadi karena isolat bakteri simbion tersebut mampu menghasilkan suatu senyawa bioaktif yang memiliki kemampuan dalam menghambat beberapa jenis bakteri. Sedangkan untuk isolat bakteri simbion yang hanya mampu menghambat satu jenis bakteri uji hal tersebut dapat terjadi karena senyawa bioaktif yang dihasilkan isolat bakteri tersebut hanya mampu menghambat satu jenis bakteri saja. Kelly dan Hite (1955) menjelaskan bahwa senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri memiliki sifat selektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri lain, hal tersebut memungkinkan suatu

bakteri dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain, namun bakteri tersebut tidak dapat menghambat pertumbuhan dari jenis bakteri yang lainnya. Menurut Levinson (2004) senyawa antibakteri kisaran luas (*broad spectrum antibacterial*) ialah senyawa antibakteri yang mampu membunuh berbagai jenis mikroorganisme, sedangkan antibakteri kisaran sempit (*narrow spectrum antibacterial*) ialah senyawa antibakteri yang mampu mematikan hanya beberapa jenis mikroorganisme.

Berdasarkan hasil uji kuantitatif, dipilih isolat terbaik yang memiliki kemampuan daya hambat terhadap bakteri uji serta besarnya zona hambatan yang dibentuk untuk dilakukan uji lanjutan. Berdasarkan hasil seleksi, isolat yang dipilih ialah isolat TSA 8.7 karena isolat tersebut memiliki kemampuan dalam menghambat 3 bakteri uji yaitu *Pseudomonas sp.*, *E. Coli* dan *Enterobacteria sp strain 5* dengan diameter zona hambat secara berurutan untuk ketiga bakteri uji ialah 11.59 mm; 9.01 mm; dan 9.71 mm.

Hasil amplifikasi 16SrDNA dari isolat TSA 8.7 menunjukkan bahwa isolat tersebut menghasilkan *single band* (pita tunggal) dengan ukuran sekitar 1500 bp sesuai dengan pembanding menggunakan marker DNA (gambar 3). Besarnya ukuran ini sesuai dengan yang diharapkan dari gen-gen 16S rDNA bakteri yang panjangnya 1541 basa (Lewin, 1993). Sabdono (2001) dalam Sabdono *et al.*, (2006) menyatakan bahwa amplifikasi DNA dari isolat bakteri yang memiliki pita tunggal menunjukkan bahwa primer yang digunakan ialah primer spesifik untuk mengamplifikasi gen 16S rDNA pada bakteri. Amplifikasi 16S rDNA telah menjadi standar untuk mempelajari filogenetik dan keanekaragaman dari mikroorganisme laut (Radjasa, 2004).

Setelah diperoleh hasil sekuensing isolat TSA 8.7, kemudian dilakukan penelusuran pada *DNA database Gen Bank* menggunakan sistem BLAST melalui situs National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Hasil penelusuran menunjukkan bahwa isolat TSA 8.7 memiliki homologi sebesar 98% dengan bakteri *Vibrio sp. JZDN1*. Hagström *et al.* (2000) menyatakan bahwa isolat yang memiliki persamaan sekuen 16S rDNA lebih dari 97 % dapat mewakili spesies yang sama. Sedangkan persamaan sekuen antara 93 % - 97 % dapat mewakili identitas bakteri

pada tingkat genus tetapi berbeda spesies. Berdasarkan pernyataan tersebut dapat dinyatakan bahwa isolat TSA 8.7 adalah spesies *Vibrio* sp. JZDN1 dengan homologi sekuen 98 %.

Bakteri *Vibrio* sp. JZDN1 merupakan kelompok bakteri dari filum Proteobacteria, kelas Gammaproteobacteria, ordo Vibrionales, family Vibrionaceae, genus *Vibrio* dan Spesies *Vibrio* sp. JZDN1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Beberapa peneliti telah menemukan bahwa beberapa jenis bakteri *Vibrio* sp. yang ditemukan bersimbiosis dengan invertebrata laut mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder diantaranya ialah *Vibrio* sp. yang bersimbiosis dengan sponge *Dysidea* sp. mampu memproduksi senyawa brominated biphenyl ethers, *Vibrio* spp. pada sponge yang sama memproduksi senyawa Synthesize citotoksid dan Antibacterial tetrabromodiphenyl ethers (Elyakov *et al.*, 1991 dalam Lee *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2001). Kemudian Oclarit *et al.*, (1994) dalam Lee *et al.*, (2001) menambahkan bahwa *Vibrio* sp. memproduksi senyawa anti-Bacillus peptide andrimid seperti yang ditemukan pada ekstrak sponge *Hyatella* sp. Selain itu Umemoto *et al.*, (2008) melaporkan bahwa *Vibrio* sp. XY-214 mampu menghasilkan senyawa β -1,3-xylanase yang berguna untuk memproduksi D-xylose, yang merupakan sumber pembuatan xylitol dan bioethanol. *Vibrio* sp. strain NM 10 yang diisolasi dari *Leiognathus nuchalis* dari perairan jepang memiliki aktivitas dalam menghambat *Pasteurella piscicida* K-III penyebab penyakit ikan pasteurellosis pada ikan laut (Sugita *et al.*, 1997).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa sampel gastropoda yang dikoleksi dari perairan Ternate adalah jenis *Stramonita armigera*. Dari 17 isolat bakteri yang diisolasi dari Gastropoda *Stramonita armigera* didapatkan 11 isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri MDR. Selanjutnya bahwa hasil identifikasi dari isolat bakteri terpilih menunjukkan bahwa isolat TSA 8.7 memiliki kesamaan terhadap jenis *Vibrio* sp. JZDN1 dengan homologi 98%.

DAFTAR PUSTAKA

- Atschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST : A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleid. Acid. Res.* 25 : 3389-3402.
- Bunjamin, D. 2005. *Recent & Fossil Indonesian Shell*. PT. Ikrar Mandiriabadi, Indonesia, p 424.
- Brock, T.D. and M.T. Madigan. 1991. *Biology of Microorganism Sixth Edition*. Prentice Hall. Englewood Cliff, New Jersey, Pp 361-362.
- Carpenter, K. E. And V. H. Niem. 1998. *The Living Marine Resources of The Western Central Pacific Volume 1 Seaweed, bivalves and gastropods*. Food and Agriculture Organization of The United Nations, Roma, P 686.
- Dwidjoseputro, D. 1989. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Djambatan, Jakarta, 188 hlm.
- Hagström, A., J. Pinhassi and U.L. Zweifel. 2000. Biogeographical Diversity Among Marine Bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 21 : 231-244.
- Lee, Y.K., J.H. Lee and H.K. Lee. 2001. Microbial Symbiosis in Marine Sponges. *J. Microbiol.* 39 (4) : 254-264.
- Leone, S., A. Silipo, E.L. Nazarenko, R. Lanzetta, M. Parrilli and A. Molinaro, 2007. Molecular Structure of Endotoxins from Gram-negative Marine Bacteria: An Update, *Mar. Drugs*. 5: 85-112
- Levinson, W. 2004. *Medical Microbiology & Immunology*. Eight edition. McGraw-Hill, New York.
- Lewin, 1993).
- McKillip, J.L., 2001. Recovery of Sublethally Injured Bacteria Using Selective Agar Overlays. *The American Biology Teacher* 63(3):184-189.
- Radjasa, O.K. 2004. Marine Invertebrate-Associated Bacteria In Coral Reef Ecosystems as a New Source Of Bioactive Compounds. *J. Coast Dev* (7) 2 : 65-70
- Sabdon (2001)
- Sugita, H., N. Matsuo, Y. Hirose, M. Iwato and Y. Deguchi. 1997. *Vibrio* sp. Strain NM 10, Isolated from the Intestine of a Japanese Coastal Fish, Has an Inhibitory Effect against *Pasteurella piscicida*. *App. Env. Microbiol.* (63) 12 : 4986-4989.
- Taslihan, A., Astuti, S.M, Nur, E.M dan Zari'ah. 2001. *Petunjuk Praktikum Cara Isolasi Bakteri dari Air, Udang dan Ikan*. BBPAP, Jepara, 33 hlm.
- Umemoto, Y., R. Onishi and T, Araki. 2008. Cloning of a Novel Gene Encoding β -1,3-Xylosidase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. Strain XY-214, and Characterization of the Gene Product. *App. Env. Microbiol.*(74) 1 : 305-308.
- Volk, W.A and M.F. Wheller. 1999. *Mikrobiologi Dasar II*, Erlangga, Bandung. 221 hlm.
- Webster, N.S., K.J. Wilson., L.L. Blackall and R.T. Hill. 2001. Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Rhopaloides odorabile*. *Appl. Environ. Microbiol.* (67) 1 : 434-444.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lvl=0&id=135623>
(29 November 2008).

<http://www.botany.hawaii.edu/basch/uhnpscesu/htms/NPSAinvr/NSAlistab.htm>
(18 November 2008).