

Pengaruh Nutrisi Dan Suhu Terhadap Selektivitas Potensi Antibakteri Dari Bakteri Yang Berasosiasi Dengan Spons

Tutik Murniasih, Joko Tri Wibowo, Masteria Yunovilsa Putra, Febriana Untari dan Mery Maryani

Pusat Penelitian Oseanografi –Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
Jl. Pasir Putih no. 1 Ancol Timur Jakarta 14430
Email : tuti007@lipi.go.id

Abstract

The Influence of nutrient and temperature to the antibacterial selectivity of Sponge Associated-Bacteria

Production of pharmacological activity by marine microorganism is strongly influenced by nutrition and environmental conditions. In this study would discuss about the influence of several type of media to the production of antibacterial agent by sponge-. associated microorganisms. About 3 sponges tissue *Theonella* sp, *Callispongia* sp. and *Lithistide* sp. collected from Seribu Island will be used for the host of associated microorganism. Agar medium used for isolation were M1 that contained amylum, yeast extract and peptone, M2 (10% marine broth media) contained yeast extract and peptone, M3 only sea water without adding any nutrients. Beside the nutrient variation, heat shock treatment at 50°C toward the sponge solution also apply to this study. The bacterial isolation data indicated that bacterial density in (CFU/100µL) of *Theonella* sp, *Callispongia* sp. and *Lithistide* sp. were minimum when spreading in M3 medium with heat shock treatment. This data showed that limiting in nutrient and heating could increasing bacterial selectivity. The antibacterial activity capability of bacterial strains isolated using M1, M2 and M3 respectively in range were 81,8-90,9%; 50-87,5% and; 66,7 -100%. This results showed that less nutrient of media will rise the number of antibacterial activity strains, and decreasing of bacterial density. This study reported that the minimum nutrient of isolation media and heat shock treatment could be used for selecting the antibacterial strains of sponge associated bacteria.

Keywords : isolation media, antibacterial, nutrient, microbial symbiont

Abstrak

Aktivitas farmakologi yang dihasilkan oleh mikroorganisme laut sangat dipengaruhi oleh nutrisi dan kondisi lingkungan. Hal tersebut mendorong untuk digali lebih dalam tentang aspek-aspek yang mempengaruhi seleksi mikroba potensial pada spons. Metode isolasi mikroba dari jaringan spons menjadi kunci dalam mengungkap potensi mikroba simbiotiknya. Dalam penelitian ini akan membahas pengaruh berbagai media isolasi bakteri yang berasosiasi dengan spons asal Kep. Seribu. Terhadap 3 spesimen spons *Theonella* sp., *Callispongia* sp. dan *Lithistide* sp. dilakukan isolasi bakteri dengan metode *direct sampling* menggunakan media M1, M2 dan M3. Media M1 mengandung nutrisi antara lain amilum, ekstrak khamir dan pepton, sedangkan media M2 mengandung sumber nutrisi ekstrak khamir dan pepton dan M3 hanya media agar dan air laut. Selain variasi nutrisi dalam media, perlakuan pemanasan pada suhu 50°C juga akan dilakukan terhadap larutan sampel spons sebelum dilakukan penyebaran pada media isolasi. Hasil isolasi bakteri yang diisolasi spons *Theonella* sp, *Callispongia* sp. dan *Lithistide* sp. menunjukkan bahwa kepadatan minimum diperoleh dengan menggunakan media M3 dengan perlakuan pemanasan. Dari data isolasi bakteri menunjukkan bahwa selain kandungan nutrisi yang minimum, perlakuan pemanasan akan menurunkan kepadatan jumlah bakteri yang tumbuh, sehingga pemanasan merupakan salah satu cara dalam seleksi isolasi bakteri yang berasosiasi

dengan spons. Hasil analisis aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa persentase strain-strain bakteri yang aktif terhadap antimikroba *Vibrio eltor*, *Eschericia coli* dan *Bacillus subtilis* dengan variasi media M1 berkisar antara 81,8-90,9%; M2 berkisar 50-87,5% dan M3 berkisar 66,7-100%. Dari data tersebut disimpulkan bahwa semakin sedikitnya nutrisi media isolasi maka semakin tingginya mikroba-mikroba potensial penghasil antibiotik. Media M3 merupakan media yang selektif untuk isolasi mikroba potensial dari spons, terbukti dengan tingginya prosentase bakteri yang aktif dan berkurangnya jumlah koloni yang tumbuh.

Kata kunci : media isolasi, antibakteri, nutrisi, mikroba simbion

PENDAHULUAN

Spons merupakan biota laut yang menduduki peringkat tertinggi untuk produksi senyawa bahan alam yang sangat potensial mempunyai aktifitas farmakologi. Dengan tekstur tubuh yang berpori dan system filter feedernya, spons merupakan reservoir bagi mikroba laut. Kurang lebih 40 % dari volume tubuh spons merupakan mikroba yang berasosiasi (Vacelet dan Donadey, 1977). Adanya hubungan biosintesis metabolit sekunder antara spons dengan mikroba yang berasosiasi telah dilaporkan dari beberapa studi sebelumnya (Thomas *et al.*, 2010). Acid Homoserine Lactone(AHL) sinyal merupakan media untuk komunikasi genetik antar spons dan bakteri simbion (Taylor *et al.*, 2004). Hubungan simbiosis antara spons dan mikroba laut dapat terjadi secara mutualisme, komensalisme maupun parasitisme. Salah satu hubungan mutualisme yang terjadi adalah kerjasama dalam pemenuhan nutrisi. Sebagai contoh yang terjadi pada sianobakteri, selain membantu spons dalam pemenuhan energi melalui proses fotosintesis, sianobakteri juga berfungsi membantu proses fiksasi nitrogen. Hampir 50% kebutuhan energi spons disuplai oleh sianobakteri, terutama untuk spons-spons yang hidup didaerah tropis. Sedangkan tubuh spons digunakan sebagai tempat hidup bagi sianobakteri (Eid dan Larsen, 2008).

Seleksi mikroba yang bersimbiosis dengan spons, dipengaruhi oleh kandungan nutrisi dan kondisi lingkungan seperti suhu, salinitas dan pH. Selain itu, jenis biota inang dan perbedaan kandungan nutrisi menjadi kunci dalam seleksi mikroba penghasil metabolit sekunder yang potensial (Hassan *et al.*, 2015). Kondisi stress (suhu, kekurangan

nutrien, tekanan dll) akan memicu bakteri untuk menghasilkan metabolit spesifik. Perlakuan "heat shock" akan menyebabkan bakteri memproduksi protein heat shock (phs)(Bukau, 1993). Sedangkan perlakuan pemberian minimum nutrisi, akan menginduksi bakteri dalam pertahanan terhadap panas, osmotik dan peroksida (Koga *et al.*, 1996) dan suhu dingin (Jiang *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 2002). Pada studi ini akan dilakukan variasi nutrisi pada media isolasi bakteri yang diisolasi dari spons asal Kepulauan Seribu. Media dengan nutrisi rendah, sedang dan tinggi digunakan untuk mengetahui media optimum dalam mendapatkan bakteri potensial penghasil senyawa aktif. Selain itu juga diperlakukan stress suhu (heat shock) untuk memicu bakteri memproduksi senyawa aktifnya.

MATERI DAN METODE

Sampel spons diambil dari perairan Untung Jawa Kepulauan Seribu. Sebanyak 3 spesimen spons *Theonella* sp, *Callispongia* sp. dan *Lithistide* sp. kemudian diisolasi bakteri simbiotiknya. Media yang digunakan untuk isolasi adalah : M1 dengan komposisi tiap literanya adalah 16 g agar, 10 g amilum, 4 g ekstrak khamir, 2 g pepton dan 50 mg nystatin dalam air laut. Media M2 merupakan 10% media marine(pronadisa) yang mengandung 1,94 g natrium klorida, 0,8g magnesium klorida, 0,5 g pepton, 3,24 g natrium sulfat, 0,18g kalsium klorida, 0,1 g ekstrak khamir, 0,055 g kalium klorida, 0,016 g sodium bikarbonat, 0,01g Fe (II) sitrat, 0,008 g kalium bromide, 0,0034 g stronsium klorida, 0,0022 g asam borat, 0,0008 g disodium fosfat, 0,0004 g natrium silikat, 0,00024 natrium fluoride, 0,00016 amonium nitrat dan 16 g agar. Media M3 terdiri dari agar dan air laut tanpa penambahan nutrisi. Bahan kimia

yang digunakan untuk ekstraksi adalah etil asetat (Merck), aseton dan methanol (Merck)

Isolasi Bakteri.

Metode isolasi yang digunakan adalah metode "direct sampling". Terdapat perlakuan suhu terhadap sampel sebelum dilakukan isolasi yaitu tanpa pemanasan dan dengan pemanasan /heat shock pada suhu 50° C, selama 40 menit sebelum penyebaran dengan pengenceran seri (10⁻⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³). Adapun media yang digunakan adalah media M1, media M2 dan media M3. Sesudah dilakukan inokulasi, inokulum diinkubasi pada suhu 28 °C. Isolasi koloni mulai dilakukan sesudah 7-14 hari masa inkubasi. Sebelum diisolasi dilakukan penghitung koloni untuk dikonfirmasi menjadi satuan CFU. Isolasi bakteri dilakukan dengan pengambilan single koloni menggunakan ose. Koloni diperbanyak menggunakan media yang sama dengan media saat isolasi. Untuk preservasi, 1 ose koloni ditanam pada media 20% gliserol dalam media marine broth dan disimpan dalam suhu dingin (-80°C).

Fermentasi dan Ekstraksi

Strain mikroba sesudah diisolasi dilakukan kultur sebanyak 100 µL, menggunakan medium air laut, yeast (0,1 g) dan pepton (0,5 g). Sebelum diinokulasi, masing-masing isolat diprakultur sebanyak 10 mL. Selanjutnya dilakukan inkubasi menggunakan shaker incubator suhu 28°C, 150 rpm selama 72 jam. Kultur dipanen dan dilakukan sentrifugasi. Pellet di ekstrak menggunakan aseton dan supernatant diekstrak dengan etil asetat. Ekstrak dikeringkan menggunakan rotavapor, sesudah kering dilarutkan dalam 1 mL

methanol dan disimpan di lemari pendingin sebelum dilakukan uji antibakteri.

Uji Antibakteri

Metode yang digunakan adalah metode difusi agar (Bauer, 1996). Terhadap ekstrak bakteri dilakukan uji antibakteri dengan kandungan ekstrak disetiap kertas cakram adalah 50µg/20µL. Bakteri yang digunakan sebagai bioindikator adalah *Bacillus subtilis* (Bs), *Vibrio eltor* (Ve) dan *Eschericia coli* (Ec) dengan konsentrasi 1,0x10⁶. Media yang digunakan adalah Muller Hinton Agar (MHA) untuk Bs, Ve. Dan untuk Ec digunakan Nutrien Agar. Masing-masing bakteri diinkubasi pada suhu 30 °C selama 12 Jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil inokulasi bakteri² yang berasosiasi dengan spons *Theonella* sp., *Callispongia* sp. dan *Lithistide* sp. pada M1, M2 dan M3. Isolasi bakteri spons *Theonella* sp. menunjukkan kepadatan tertinggi dengan menggunakan media M1, sedangkan dengan pemanasan kepadatan tertinggi menggunakan media M2 (Tabel 1). Sedangkan kepadatan terendah dengan menggunakan media isolasi M3 dengan pemanasan. Sedangkan isolasi bakteri spons *Callispongia* sp. tanpa pemanasan maupun dengan pemanasan menunjukkan kepadatan tertinggi pada media M1. Untuk kepadatan terendah dengan menggunakan media M3 dengan pemanasan. Isolasi bakteri spons *Lithistide* sp. pada perlakuan tanpa pemanasan menunjukkan kepadatan tertinggi pada media isolasi M3, namun dengan pemanasan menunjukkan kepadatan tertinggi pada media M1. Kepadatan terendah dengan menggunakan media M3

Tabel 1. Kepadatan bakteri spons dalam berbagai media isolasi

Perlakuan	Sampel	Nilai CFU/100 µL dalam media		
		M1	M2	M3
Tanpa pemanasan	<i>Theonella</i> sp.	1,0x10 ⁴	7,4x10 ²	5,1x10 ³
	<i>Callispongia</i> sp.	2,4x10 ⁴	1,6x10 ²	-
	<i>Lithistide</i> sp.	4,0x10 ³	1,3x10 ³	1,8x10 ⁴
Dengan pemanasan 50°C	<i>Theonella</i> sp.	3,4x10 ¹	3,3x10 ²	6,0x10
	<i>Callispongia</i> sp.	-	3,1x10 ²	1,0x10
	<i>Lithistide</i> sp.	2,9x10 ³	1,8x10 ³	4,0x10 ²

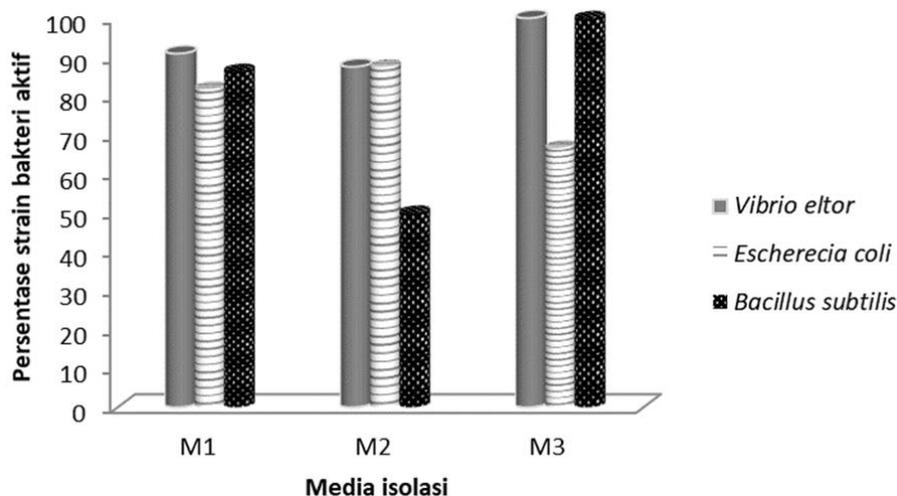
dengan pemanasan. Dari hasil isolasi ketiga spons menunjukkan bahwa rata-rata koloni terbanyak didapatkan dengan media isolasi M1 tanpa pemanasan dan koloni terendah didapatkan menggunakan media M3 dengan pemanasan. Jika ditelaah media M1 mengandung nutrisi yang lengkap sumber karbon dan nitrogennya, sedangkan media M3 mengandung media yang miskin sumber karbon dan nitrogen. Komposisinya media M3 mengandung media yang miskin sumber karbon dan nitrogen. Komposisinya media M3 mengandung air laut dan agar, media M2 mengandung agar, yeast dan pepton, sedangkan media M1 mengandung agar, yeast, pepton dan amilum. Studi optimasi media kultivasi pada isolasi mikroba yang berasosiasi dengan spons *Cymbastela concentrica*, *Tedania* sp. dan *Scopalina* sp menunjukkan bahwa media dengan kaya nutrisi akan menghasilkan bakteri dengan keragaman morfologi dan genetik yang tinggi (Taylor *et al.*, 2007).

Kepadatan bakteri dari spons *Theonella* sp. untuk ketiga media M1, M2 dan M3 tanpa dilakukan pemanasan berkisar $7,4 \times 10^2 - 1,0 \times 10^4$. Dengan adanya perlakuan pemanasan kisaran kepadatan bakteri berkisar antara $6,0 \times 10^3 - 3,3 \times 10^2$. Kisaran kepadatan bakteri yang diisolasi dari spons *Callispongia* sp. tanpa perlakuan pemanasan berkisar $1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^4$, sedangkan dengan pemanasan berkisar antara $1,0 \times 10^3 - 1,1 \times 10^2$. Untuk kepadatan bakteri yang diisolasi dari spons *Callispongia* sp. tanpa pemanasan berkisar $1,3 \times 10^3 - 1,3 \times 10^4$, dengan pemanasan

adalah $4,0 \times 10^2 - 2,9 \times 10^3$. Dari data isolasi bakteri menunjukkan bahwa perlakuan pemanasan akan menurunkan kepadatan jumlah bakteri yang tumbuh, sehingga pemanasan “heat shock” merupakan salah satu cara dalam seleksi isolasi bakteri yang berasosiasi dengan spons. Hal ini sesuai dengan tujuan perlakuan “heat shock” yaitu untuk mendapatkan bakteri yang mempunyai metabolit spesifik. Selain itu profil kepadatan bakteri akan menurun, sehingga akan memudahkan dalam perlakuan isolasi nya.

Dari data tersebut menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan nutrisi yang rendah dengan pemanasan akan menurunkan kepadatan bakteri yang diisolasi dari spons. Selain kepadatannya, bagaimana dengan pengaruh aktivitas antibakterinya.

Isolasi bakteri spons dengan menggunakan media M3 media dengan nutrisi minimum akan menghasilkan strain-strain bakteri yang potensial (Gambar 1). Terutama terhadap *Vibrio eltor* dan *Bacillus subtilis* aktivitasnya mencapai 100% dari bakteri yang diuji. Salah satu cara untuk memicu produksi antibiotik pada mikroba adalah dengan mengurangi nutrisinya (Demain dan Carlo, 2006). Kurangnya asupan energi akan menyebabkan bakteri beradaptasi dengan perubahan fungsi fisiologinya (Murinova dan Dercova, 2014). Kemampuan bakteri dalam menjaga



Gambar 1. Prosentasi koloni bakteri yang mempunyai aktivitas antibakteri dengan variasi media tumbuh

fungsi biologi pada kondisi stress akan mengakibatkan perubahan kandungan protein, sterol, hopanoid dan karotenoid, namun mayoritas perubahan terjadi pada komposisi membrane lipid (Heipieper *et al.*, 1994; Weber dan DeBont, 1996). Berdasarkan data-data di atas disimpulkan bahwa kurangnya nutrisi pada media isolasi, akan memicu tingginya mikroba-mikroba potensial penghasil antibiotik, walaupun tingkat viabilitas pertumbuhannya rendah.

KESIMPULAN

Jenis media isolasi sangat berkorelasi dengan kandungan nutrisi didalamnya dan hal tersebut sangat berpengaruh terhadap kepadatan dan produktivitas metabolit sekundernya. Kandungan nutrisi yang tinggi akan menghasilkan jumlah koloni yang banyak atau viabilitas tinggi, namun kemampuan aktivitas antibakteri dari bakteri yang tumbuhnya kecil. Dengan perlakuan kekurangan nutrisi baik sumber karbon maupun sumber nitrogen pada media isolasi, maka koloni yang tumbuh lebih sedikit namun kemampuan aktifitas antibakterinya lebih tinggi. Perlakuan pemberian nutrisi yang minimum dapat digunakan sebagai salah satu cara dalam menyeleksi bakteri yang potensial menghasilkan substansi aktif antibakteri.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis sangat berterima kasih kepada Prof. Peter Schupp, atas kontribusinya dalam training metode isolasi mikroba laut dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia yang telah memberikan dana penelitian melalui program Unggulan Pangan dan Obat.

DAFTAR PUSTAKA

- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. & Tenckhoff, M. 1996. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45(4):493-498.
- Bukau, B. 1993. Regulation of the *Escherichia coli* Heat-Shock Response. *Mol. Microbiol.* 9(4):671-680.
- Eid, M., & Larsen, R. J. 2008. *The science of subjective well-being*. Guilford Press.
- Hassan, S.W.M., Raouf, U.M. & Ali, M.A.R. 2015. Antagonistic Interactions and Phylogenetic Diversity of Antimicrobial Agents Producing Marine Bacteria in Suez Bay. *Egypt. J. Aqua. Res.* 41:57-67. DOI : 10.1016/j.ejar.2015.02.005.
- Heipieper, H. J., Weber, F. J., Sikkema, J., Keweloh, H., & de Bont, J. A. 1994. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnol.* 12(10):409-415.
- Jiang, X., & Chai, T. J. 1996. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. *App. Environ. Microbiol.* 62(4):1300-1305.
- Koga, T., Nakajyo, Y., & Komoto, A. 1996. Detection of Hsp60 (GroEL)-like proteins in *Vibrio parahaemolyticus* and vibrio species by Western immunoblotting analysis. *Lett. App. Microbiol.* 23(5):295-298.
- Murinova, S & Dercova, K. 2014. Response Mechanisms of Bacterial Degrades to Environmental Contaminants on the level of Cell walls and cytoplasmic membrane. *Int. J. Microbiol.* 2014:1-16 DOI : 10.1155/2014/873081
- Taylor, M.W., Schupp, P.J., Baillie, H.J., Charlton, T.S., De Nys, R., Kjelleberg, S. & Steinberg, P.D. 2004. Evidence for acyl homoserine lactone signal production in bacteria associated with marine sponges. *App. Environ. Microbiol.* 70(7):4387-4389. DOI : 10.1128/AEM.70.7.4387.4389.2004.
- Taylor, M. W., Radax, R., Steger, D., & Wagner, M. 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol. Molecul Biol. Rev.* 71(2):295-347.
- Thomas, T. R. A., Kavlekar, D.P. & LokaBharathi, P.A. 2010. Marine drugs from sponge-microbe association—A review. *Mar. Drugs* 8(4):1417-1468. DOI : 10.3390/md 8041417.
- Vacelet, J., & Donadey, C. 1977. Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 30(3):301-314.
- Weber, F.J., & de Bont, J.A. 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica et Biophysica*

Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes.
1286(3): 225-245.

Wong, H.C., Peng, P.Y., Lan, S.L., Chen, Y.C.,
Lu, K.H., Shen, C.T., & Lan, S.F. 2002.
Effects of heat shock on the

thermotolerance, protein composition,
and toxin production of *Vibrio*
parahaemolyticus. *J. Food Protect.*
65(3):499-507.