

# Bakteri Simbion Karang Lunak *Sinularia* sp. sebagai Agen Antibakteri

Sekar Widyaningsih\* dan Nor Sa'adah

Program Studi Oseanografi, Fakultas Teknik dan Ilmu Kelautan, Universitas Hang Tuah  
Jl. Arif Rahman Hakim 150 Surabaya 60111  
Email : sekar.widyaningsih@hangtuah.ac.id

## Abstract

### *Symbiotic bacteria of soft-coral Sinularia sp. as antibacterial agent*

The disease caused by bacterial pathogen infection has become a major problem in the world of health. Therefore, it needs new bioactive compound to resolve that problem. Symbiotic bacteria of softcoral are one promising source. This is because symbiotic bacteria of softcoral have the same bioactive compounds as their host. Symbiotic bacteria were isolated from softcoral *Sinularia* sp. that collected from Tanjung Gelam Waters, Karimunjawa Jepara. The symbiotic bacteria screened for antibacterial activity against *E.coli*, *Proteus* sp., *Enterobacter* sp. and *S. aureus* with diffusion agar method. One of ten symbiotic bacteria was active against, SNTGA 5, with inhibition zone  $9.067 \pm 0.305$  mm against *E coli*,  $8.533 \pm 0.416$  mm against *S. aureus*,  $9.067 \pm 0.058$  mm against *Enterobacter* sp., dan  $9.1 \pm 0.557$  mm against *Proteus* sp.. The molecular identification based on partial 16S DNA, that active isolate was closely related to *Pseudomonas stutzeri*.

**Keywords:** Antibacterial, *Sinularia* sp., symbiotic bacterial, PCR 16S DNA, *Pseudomonas stutzeri*

## Abstrak

Penyakit akibat infeksi bakteri patogen telah menjadi masalah utama dalam dunia kesehatan. Oleh karenanya, diperlukan bahan aktif baru guna mengatasi masalah tersebut. Bakteri simbion karang lunak merupakan salah satu sumber yang menjanjikan. Hal ini karena bakteri simbion karang lunak memiliki senyawa bioaktif yang sama dengan inangnya. Bakteri simbion diisolasi dari karang lunak *Sinularia* sp. yang dikoleksi dari Perairan Tanjung Gelam Karimunjawa Jepara. Bakteri simbion diuji aktivitasnya terhadap *E.coli*, *Proteus* sp., *Enterobacter* sp. dan *S. aureus* dengan metode difusi agar. Satu dari 10 bakteri simbion memiliki aktivitas antibakteri, SNTGA5, dengan besar zona hambat  $9.067 \pm 0.305$  mm terhadap *E coli*,  $8.533 \pm 0.416$  mm terhadap *S. aureus*,  $9.067 \pm 0.058$  mm terhadap *Enterobacter* sp., dan  $9.1 \pm 0.557$  mm terhadap *Proteus* sp.. Identifikasi molekuler dilakukan dengan menggunakan PCR 16S DNA, dimana isolat yang aktif memiliki memiliki kekerabatan terdekat dengan *Pseudomonas stutzeri*.

**Kata kunci :** Antibakteri, *Sinularia* sp., PCR 16S DNA, *Pseudomonas stutzeri*

## PENDAHULUAN

Salah masalah kesehatan yang disebabkan oleh bakteri patogen *E. coli*, *Proteus* sp., *Enterobacter* sp. dan *S. aureus* adalah *foodborne infections* dan *waterborne infections* (Thielman dan Guerrant, 2004). Penggunaan obat yang tidak tepat dan pengobatan yang tidak tuntas pada suatu penyakit akan menyebabkan bakteri

patogen menjadi resisten (Radjasa et al., 2007a).

Invertebrata laut seperti karang lunak, diketahui memiliki kandungan metabolit sekunder yang melimpah, sehingga menjadi target eksplorasi sumber senyawa bioaktif alami (Radjasa, et al., 2007b; Thiel dan Imhoff, 2003). Untuk dimanfaatkan sebagai obat diperlukan jumlah yang besar, dan hal tersebut menjadi masalah tersendiri bagi

ketersediaan karang lunak di alam. Diperlukan alternatif lain, seperti pemanfaatan bakteri simbiotiknya. Seperti yang diungkapkan oleh Burgess *et al.*, (2003), bahwa mikroorganisme simbiotik mampu mensintesis metabolit sekunder seperti organisme inangnya. Oleh karenanya, bakteri yang bersimbiosis dengan *Sinularia* sp. dapat memberi kontribusi sebagai sumber alternatif baru, khususnya sebagai antibakteri. Seperti *Paenibacillus campinasensis* yang diisolasi dari karang lunak *Lobophytum* sp. yang memiliki aktivitas antibakteri *E. coli* dan *S. aureus* (Murti dan Radjasa, 2012). Maka dilakukanlah penelitian mengenai aktivitas antibakteri dari bakteri simbiotik karang lunak *Sinularia* sp. ini.

## MATERI DAN METODE

Materi yang digunakan dalam penelitian ini antara lain bakteri yang diisolasi dari *Sinularia* sp. dari Perairan Tanjung Gelam, Karimunjawa, Jepara. Kultur bakteri patogen *E. coli*, *S. aureus*, *Enterobacter* sp., dan *Proteus* sp. sebagai bakteri uji.

### Kultur dan Isolasi bakteri simbiotik

Kultur dan isolasi bakteri simbiotik dari karang lunak *Sinularia* sp. yang diperoleh dari Perairan Tanjung Gelam Karimunjawa Jepara dilakukan menggunakan media Zobell 2216E, dengan metode streak, dan diinkubasi selama 2x24 jam (Madigan *et al.* 2000; Radjasa *et al.*, 2007a).

### Antibacterial test

*Antibacterial test* dilakukan dengan metode difusi agar. Kultur setiap bakteri uji patogen pada fase logaritma *distreak* di permukaan agar rose sebanyak 100µL dan didiamkan selama 10-15 menit. Kultur bakteri simbiotik yang juga fase logaritma dimasukkan pada *paperdisk* dan ditempelkan di atas agar rose berbakteri patogen. Hasil uji diinkubasi selama 1x24 jam, dan dilakukan pengukuran zona bening. Aktivitas antibakteri ditentukan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri (Radjasa *et al.*, 2007a).

### Amplifikasi PCR dan Sequencing DNA

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode Radjasa *et al.* (2007b).

Genomik DNA bakteri yang memiliki aktivitas antibakteri diisolasi dari materi sel yang diambil dari agar di cawan petri. Materi tersebut dilarutkan dalam air steril dan dibekukan pada suhu -80°C dan dipanaskan pada suhu 95°C sebanyak lima kali ulangan. Amplifikasi PCR 16S RNA bakteri simbiotik *Sinularia* sp., purifikasi produk PCR dan analisis sekuensing dilakukan berdasarkan metode Radjasa *et al.* (2007c). Hasil data sekuensing dicocokkan dengan data homologi dalam *BLAST database*.

### Screening PCR – NRPS

Amplifikasi gen Non-Ribosomal Peptide Synthetases (NRPS) dengan menggunakan primer A2gamF (5' AAG GCN GGC GSB GCS TAY STG CC 3') dan A3gamR (5' TTG GGB IKB CCG GTS GIN CCS GAG GTG 3') (Radjasa *et al.*, 2007c). Amplifikasi DNA dilakukan dengan mesin DNA *thermal cycler* (MyCycler, BioRad) dengan metode Radjasa *et al.*, (2007b).

### Analisa Sekuensing DNA

Analisis sekuens DNA isolat bakteri terbaik kemudian dibandingkan dengan sekuens DNA pada basis data (database) DNA. Penelusuran dilakukan dengan menggunakan internet melalui program pelacakan database Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) pada *National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health, USA* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Altschul *et al.*, 1997; Radjasa *et al.*, 2008).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Terdapat sepuluh bakteri simbiotik dari karang lunak *Sinularia* sp, dimana hanya satu isolat bakteri saja (SNTGA5) yang ditemukan mampu menghambat pertumbuhan empat bakteri patogen (Tabel 1). Identifikasi molekuler isolat bakteri simbiotik aktif dilakukan berdasarkan 16S rDNA, dan hasil menunjukkan isolat memiliki kekerabatan dengan *Pseudomonas stutzeri* (Tabel 2). Hasil *screening* menunjukkan isolat bakteri aktif mampu mengamplifikasi fragmen gen NRPS (Gambar 1). Masalah bakteri patogen yang berubah resisten terhadap berbagai antibiotik menjadi salah satu masalah utama di bidang kesehatan. Hal tersebut dapat menyebabkan meningkatnya mortalitas,

morbilitas dan biaya kesehatan (Cohen, 1994; Wang, 2003). Seperti menurut Thielman dan Guerrant (2004), infeksi diare disebabkan oleh *foodborne infections* dan *waterborne infections* yang disebabkan bakteri *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* dan *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC).

Organisme laut yang berasal dari ekosistem terumbu karang menjadi sumber yang menarik dan penting dalam produksi *natural product*. Hal tersebut dikarenakan mereka memproduksi berbagai senyawa bioaktif guna menunjang aktivitas mereka di alam (Sulistiyani *et al.*, 2010). Invertebrata laut yang juga bagian dari ekosistem terumbu karang diketahui kaya akan senyawa metabolit yang berpotensi untuk dikembangkan (Faulkner, 2001).

Pemanfaatan produk alam secara langsung menjadi masalah lain. Hal tersebut, dikarenakan suplai yang terbatas, sehingga digantikan bakteri simbiotiknya. Seperti menurut Perez Matos *et al.* (2007), bakteri yang bersimbiosis mampu mensintesa senyawa bioaktif yang mirip dengan inangnya. Pada beberapa penelitian bakteri simbiotik invertebrata laut, khususnya karang

lunak terbukti mampu memproduksi senyawa metabolit sekunder yang mirip dengan inangnya, seperti bakteri simbiotik *Sinularia polydactyla* mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* (Radjasa *et al.*, 2007c).

Penelitian bakteri simbiotik *Sinularia* sp. menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap empat bakteri patogen, *E. coli*, *Proteus* sp., *Enterobacter* sp. dan *S. aureus*, dengan adanya zona hambat (Tabel 1).

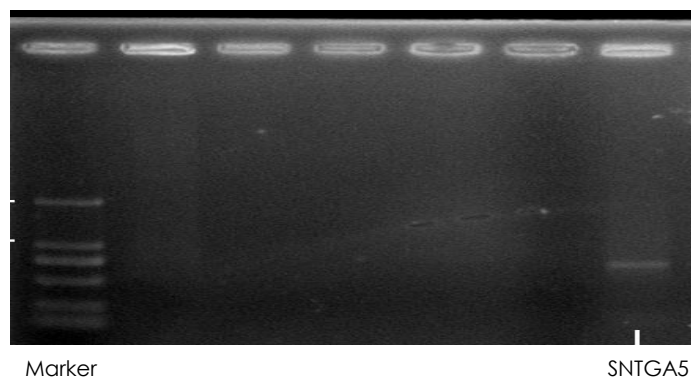
Hasil DNA sekuensing isolat SNTGA5 yang mampu menghambat *E. Coli*, *S. aureus*, *Proteus* sp., dan *Enterobacter* sp. memiliki kesamaan homologi sebesar 100%, dan berkerabat dengan *Pseudomonas stutzeri* (Tabel 2). Seperti pada Uzair *et al.* (2007), yang mengisolasi bakteri *Pseudomonas stutzeri* dari saluran usus ikan Ribbon (*Desmodema* sp.) mampu menghambat bakteri patogen *S. aureus*. Fragmen gen NRPS berhasil diamplifikasi dari bakteri SNTGA5 (Gambar 1). Oleh karenanya isolat SNTGA5 diduga termasuk kelompok peptida yang dihasilkan melalui jalur nonribosomal. Seperti bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak *Sinularia polydactyla*, TASC.16 yang menghambat *Streptococcus equi* yang juga ditemukan berfragmen NRPS (Isrina, 2008).

**Tabel 1.** Aktivitas antibakteri bakteri simbiotik karang lunak *Sinularia* sp. terhadap patogen

No.	Isolat bakteri simbiotik	Diameter zona hambat (mm)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Proteus</i> sp.
	SNTGA5	9.067 ± 0.305	8.533 ± 0.416	9.067 ± 0.058	9.1 ± 0.557

**Tabel 2.** Identifikasi molekuler isolate bakteri

No.	Kode bakteri	Panjang	Kekerabatan terdekat	Homologi	No. akses
1	SNTGA5	811	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100%	JF727659.1



**Gambar 1.** Hasil amplifikasi gen NRPS isolat bakteri SNTGA 5

Peptida nonribosomal dapat menghasilkan berbagai macam molekul peptide berantai asam lemak, asam amino non proteinogenik, asam karboksil, cincin heterosiklik dan asam amino yang termodifikasi. Strukturnya juga dapat bercabang atau siklik, dan masih dapat teroksidasi atau tereduksi (Marahiel and Finking, 2004).

## KESIMPULAN

Bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak *Sinularia* sp. yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap empat bakteri patogen *E. coli*, *Proteus* sp., *Enterobacter* sp. dan *S. aureus*. adalah *Pseudomonas stutzeri*. Selain itu, bakteri simbiosis ini juga diduga termasuk kelompok peptide yang mampu mengaplikasikan fragmen gen NRPS. Diharapkan penelitian ini digunakan sebagai solusi awal dalam masalah penanganan bakteri patogen, dan masalah suplai ketika mencari bahan bioaktif dari alam.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Prof. Ocky Karna Radjasa yang telah memberi dana untuk penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids Res.* 25(17):3389-3402.

Burgess, J.G., Boyd, K.G., Armstrong, E., Jiang, Z., Yan, L., Berggren, M. & Adams, D.R. 2003. The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling*. 19(S1):197-205.

Cohen, M.L. 1994. Antimicrobial Resistance: Prognosis for Public Health. *Trends Microbiol.* 2 : 422–425.

Faulkner, D.J. 2001. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 18(1):1R-49R.

Finking, R., & Marahiel, M.A. 2004. Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58:453-488. DOI : 10.1146/annurev.micro.58.030603.123615

Isrina, S.O.S. & Lammner, C. 2008. Antibacterial Property of Marine Bacterium *pseudomonas* sp. Associated with A Soft

Coral against Pathogenic *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*. *J. Coast. Dev.* 11(3):113-120.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall. New Jersey.

Murti, P.D.B. & Radjasa, O.K. 2012. Antibacterial Activity of Bacterial Symbiont of Soft Coral *Lobophytum* sp. against MDR Bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Coast. Dev.* 15(3):297–302.

Radjasa, O. K., Kencana, D. S., Sabdono, A., Hutagalung, R. A., & Lestari, E. S. 2007a. Antibacterial activity of marine bacteria associated with sponge *Aaptos* sp. against Multi Drugs Resistant (MDR) strains. *J. Mat. Sains.* 12(4):147-152.

Radjasa, O. K., Martens, T., Grossart, H. P., Brinkhoff, T., Sabdono, A., & Simon, M. 2007b. Antagonistic Activity of a Marine Bacterium *Pseudoalteromonas luteoviolacea* TAB4. 2 Associated with Coral *Acropora* sp. *J. Biol. Sci.* 7(2):239-246. DOI : 10.3923/jbs.2007.239.246

Radjasa, O. K., Salasia, S. I. O., Sabdono, A., Wiese, J., Imhoff, J. F., Lämmner, C., & Risk, M. J. 2007c. Antibacterial activity of marine bacterium *Pseudomonas* sp. associated with soft coral *Sinularia polydactyla* against *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Int. J. Pharmacol.* 3(2):170-174.

Radjasa, O.K., Sabdono A., Wiese, J. & Imhoff, J.F. 2008. Coral as Source Of Bacteria With Antimicrobial Activity. *J. Coast. Dev.*, 11(3):121-130.

Sulistiyani, Nugraheni, S.A., Khoeri, M.M., Sabdono, A. & Radjasa, O.K. 2010. Antibacterial Activity of Bacterial Symbionts of Softcoral *Sinularia* sp. against Pathogenic Resistant Bacteria. *J. Coast. Dev.*, 13(2):113-118.

Thiel, V., & Imhoff, J.F. 2003. Phylogenetic Identification of Bacteria with Antimicrobial Activities Isolated from Mediterranean Sponges. *Biomol. Eng.* 20(4-6):421-423.

Thielman, N.M., & Guerrant, R.L. 2004. Acute Infectious Diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 350 (1):38-47.

Wang, T.K.F. & Ho, P.L. 2003. The Challenge of Antibiotic Resistance in Asia: Problems and Solutions. *Med. Prog.* 8:41-49.