

ISOLASI DAN SKRINING AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI BAKTERI SIMBION NUDIBRANCHIA *Phyllidiella pustulosa* dan *Thuridilla lineolata*

(Isolation and Screening the Antibacterial activity from Symbiotic Bacteria of Nudibranch, *Phyllidiella pustulosa* and *Thuridilla lineolata*)

Ade Kurniawan Arie^{1*}, Rosita A. J. Lintang¹, Remy E. P. Mangindaan¹, Agung B. Windarto¹, Losung Fitje¹, Sammy N.J. Longdong²

¹Program Studi Ilmu Kelautan, FPIK UNSRAT Manado.

²Program Studi Budidaya Perairan, FPIK UNSRAT Manado .

*email: ade.arie1998@gmail.com

Abstract

Nudibranchs are marine invertebrates belongs to the class of Gastropoda that are able to camouflage and develop a self-defense systems. Marine bacteria contain chemicals compounds that have potentials on marine drugs discovery through the secondary metabolism. The purpose of this study was to isolate the symbiotic bacteria from nudibranchs *Phyllidiella pustulosa* and *Thuridilla lineolata* and to screen the antibacterial activity of these bacterial isolates against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Isolation and culture of the symbiotic bacteria was made on B1 (solid) media. The results of the antibacterial assay showed that the symbiotic bacterial isolates from *Phyllidiella pustulosa* and *Thuridilla lineolata* were able to inhibit the growth of the *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* test.

Keywords: nudibranch, *Phyllidiella pustulosa*, *Thuridilla lineolata*, bacteria, antibacterial

Nudibranch adalah avetabrata laut dalam kelas Gastropoda yang mampu melakukan kamuflase dan mengembangkan sistem pertahanan diri. Bakteri laut mengandung senyawa kimia yang berpotensi sebagai bahan obat-obatan yang dihasilkan melalui metabolit sekunder. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengisolasi bakteri yang bersimbion dengan nudibranch *Phyllidiella pustulosa* dan *Thuridilla lineolata*, kemudian mengamati aktivitas antibakteri dari isolat bakteri tersebut terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Isolasi dan kultur bakteri yang bersimbion dibuat pada media B1 (padat). Skrining aktivitas antibakteri menunjukkan isolat bakteri yang bersimbion dengan nudibranch *Phyllidiella pustulosa* dan *Thuridilla lineolata* mampu menghambat pertumbuhan organisme uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

Kata kunci: nudibranch, *Phyllidiella pustulosa*, *Thuridilla lineolata*, bakteri, antibakteri

PENDAHULUAN

Bakteri laut memiliki ukuran yang sangat kecil, akan tetapi satu sel bakteri laut dapat mengandung senyawa kimia yang berpotensi untuk obat-obatan, suplemen nutrisi, kosmetik, agrokimia, probe kimia dari enzim. Umumnya senyawa kimia potensial ini berasal dari metabolit sekunder mikroba (Novianti, 2008). Beberapa biota laut yang diketahui dapat menghasilkan bahan hayati yang memiliki aktivitas biologis di antaranya yaitu bryozoa, spons, moluska dan nudibranch (Proksch *dkk*, 2002).

Nudibranch adalah avertebrata laut dalam kelas Gastropoda yang tidak memiliki cangkang serta mampu mengembangkan sistem pertahanan diri antara lain dengan kamuflase dan senyawa kimia "chemical defence". Nudibranch mampu mensintesis metabolit sekunder dari bahan makanannya seperti Spons, Bryozoa, Nudibranch dan Coelenterata. Chromodorolide A diisolasi dari nudibranch *Chromodoris cavae* sebagai antimikroba secara *in vitro* (Karunasagar *et al.*, 1999).

Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan diketahui nudibranch memiliki potensi untuk menghasilkan senyawa

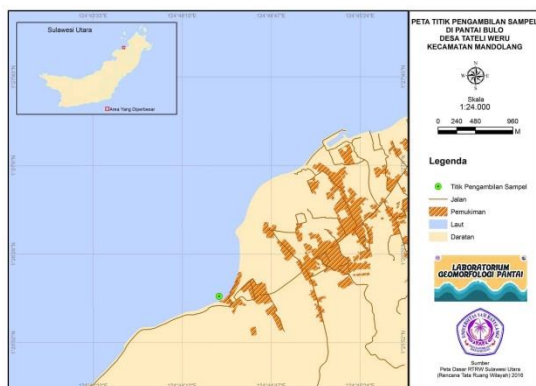
antibakteri (Reddy *et. al.*, 2015; Karuso and Scheuer, 2002). Berbagai pendekatan telah dilakukan untuk mendapatkan senyawa antibiotik yang baru, salah satunya adalah dengan mencari senyawa bioaktif dari mikroorganisme yang bersimbiosis dengan invertebrata laut yang berpotensi sebagai antibakteri *Multi Drug Resistant* (MDR) (Pringgenies, 2009; 2010, Pringgenies dan Dananjoyo, 2011; Pringgenies dan Renta, 2014).

Berbagai penyakit yang disebabkan oleh bakteri pada saat ini semakin banyak dan diperlukan pencarian senyawa antibakteri yang baru. Optimasi dan kultivasi merupakan salah satu pendekatan untuk mendapatkan isolat bakteri simbiosis yang menghasilkan aktivitas antibakteri terbaik. Oleh sebab itu, eksplorasi bakteri simbiosis dari Nudibranch perlu dilakukan. Hal inilah yang menjadi latar belakang penelitian ini dilakukan.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Rangkaian penelitian dimulai pada Desember 2019 dan berakhir Mei 2020. Tempat penelitian yaitu pantai Bulu, Desa Tateli Weru, Kecamatan Mandolang (Gambar 1) sebagai lokasi pengambilan sampel dan Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasetika Laut, FPIK, UNSRAT Manado dimana dilakukan proses isolasi, kultur dan skrining aktivitas antibakteri.



Gambar 1. Peta Lokasi Penelitian

Pengambilan dan Identifikasi Sampel

Sampel nudibranch didapat dari Pantai Bulu dengan cara menyelam menggunakan 1 set alat SCUBA pada kedalaman sekitar $\pm 3-10$ meter dan pengambilan individu organismemenggunakan pinset. Sampel yang didapat langsung dimasukkan kedalam plastik sampel untuk diidentifikasi dan dianalisis lanjut.

Identifikasi sampel Nudibranch mengacu pada WoRMS (*World Register of Marine Species*), buku "*Nudibranch & Sea Slug Identification*" (Gosliner dkk, 2018). dan Ompi (2019)

Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini seperti cawan petri, tabung reaksi, pisau, erlenmyer dan pinset dicucibersih, dikeringkan, dibungkus kemudian disterilkan dalam oven pada suhu 150°C selama ± 2 jam (sterilisasi kering). Media untuk pertumbuhan mikroorganisme disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (sterilisasi basah).

Media Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri menggunakan media B1 yang mengandung pepton, ekstrak daging (meat extract) dan NaCl. Sebanyak 0,5 gram pepton, 0,3 gram ekstrak daging, 0,3 gram NaCl dilarutkan dalam 100 ml aquades, diotoklaf selama ± 20 menit, pada suhu 121°C . Media cair dibuat tanpa penambahan agar, sedangkan untuk media padat ditambahkan 2% agar.

Isolasi Bakteri

Sampel Nudibranch dicuci dengan air laut steril untuk menghilangkan pengotor yang melekat pada permukaan tubuh. Dalam kondisi aseptik sampel dipotong dan digerus menggunakan mortar selanjutnya ditambahkan 1000 μl air laut

steril. Dengan menggunakan pipet mikro sebanyak, diambil 100 µl disebar pada permukaan media B1 menggunakan *spreader* hingga semua permukaan tertutup dan diinkubasi selama 2x24 jam.

Pemurnian Bakteri

Untuk mendapatkan koloni terpisah yang merupakan biakan murni, maka koloni bakteri yang bertumbuh kemudian dikultur pada media baru dengan metode gores (*streak plate method*). Dengan menggunakan jarum ose steril kultur bakteridigoreskan ke media padat sehingga membentuk kuadran. Setiap menggores ujung kuadran yang baru jarum ose disterilkan kembali dan dicelupkan ke dalam ethanol. Setelah selesai diinkubasi selama 1x24 jam. Penggoresan ini dilakukan berulang-ulang sehingga diperoleh koloni tunggal / murni.

Preparasi Kultur Bakteri Uji

Bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli* dikultur dalam wadah yang terpisah selama 1x24 jam menggunakan media yang sama dengan media isolasi bakteri. Kultur ini selanjutnya akan ditambahkan atau dicampurkan ke dalam media padat untuk pengujian aktivitas antibakteri

Skrining Antibakteri dari Bakteri Symbion Nudibranch

Dari isolat murni yang diperoleh kemudian dilakukan skrining antibakteri untuk mengetahui isolat mana yang memiliki aktivitas antibakteri. Bakteri uji yang digunakan adalah *S. aureus* dan *E. coli*. Dengan menggunakan jarum ose isolat murni yang adaselanjutnya ditotolkan atau digoreskan ke atas permukaan media B1 padat yang mengandung bakteri uji yang telah disiapkan sebelumnya. Kultur ini diinkubasi dan pengamatan dilakukan setelah 1x24 jam. Munculnya zona bening di sekitar koloni bakteri merupakan tanda adanya penghambatan terhadap bakteri uji.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Organisme Nudibranch

Berdasarkan pengamatan terhadap bentuk, warna, dan corak/pola sampel maka diketahui 2 jenis sampel yakni *Phyllidiella pustulosa* dan *Thuridilla lineolata*. *P. pustulosa* dengan ciri-ciri yaitu memiliki ujung berwarna hijau dan pada bagian mantel berwarna hitam, *P. pustulosa* juga memiliki ukuran badan yang terbilang besar dari antara spesies nudibranch lainnya. Sedangkan *T. lineolata* memiliki ukuran tubuh yang sangat kecil, samping, berwarna biru cerah dan pola berwarna oranye dan garis melingkar disepanjang tubuhnya (Gambar 2).



(a)

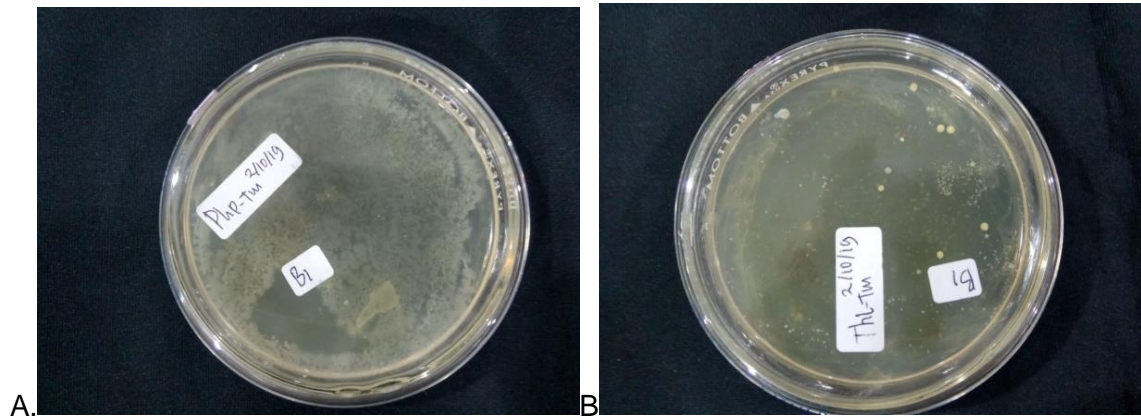
(b)

Gambar 2. (a) *Phyllidiella pustulosa* dan (b) *Thuridilla lineolata*

Isolasi Bakteri Nudibranch

Pengamatan terhadap sebaran kultur pada media memperlihatkan adanya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan terbentuknya koloni pada permukaan

media. Ini berarti bahwa terdapat bakteri yang hidup bersimbion atau berasosiasi dengan *P. pustulosa* dan *T. lineolata* (Gambar 3)

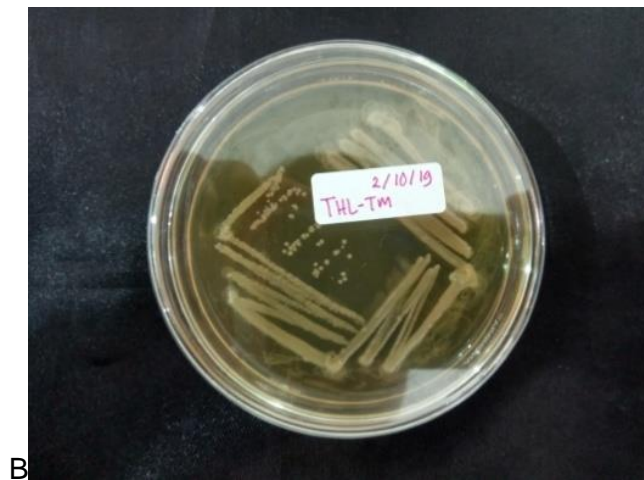


Gambar 3. Isolasi bakteri *Phylidiella pustulosa*(A) dan *Thrudilla lineolata*(B)

Dari pengamatan yang dilakukan terlihat adanya beberapa koloni yang muncul yang tumbuh memiliki berbagai bentuk, ada yang bulat dan ada juga yang bergelombang. Untuk mendapatkan isolat murni, maka dilanjutkan dengan kultur gores kuadran.

Setelah diinkubasi selama 1x24 jam maka didapatkan jumlah koloni tunggal dari *Phylidiella pustulosa* sebanyak 18 koloni dan dari *Thrudilla lineolata* 22 koloni (Gambar 4, Tabel 1)





Gambar 4. Kultur isolat bakteri simbios *Phylidiella pustulosa*(A) dan *Thrudilla lineolata*(B)

Tabel 1. Jumlah koloni tunggal bakteri *Phylidiella pustulosa* dan *Thrudilla lineolata*

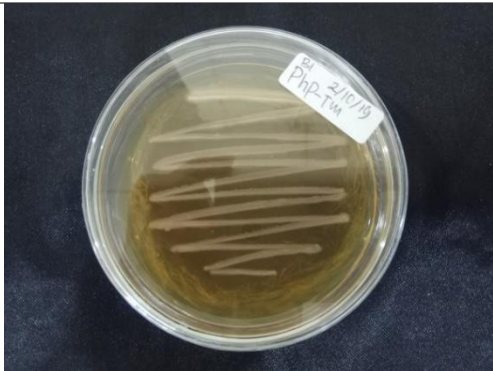
Jenis Nudibranchia	Jumlah Koloni Tunggal
<i>Phylidiella pustulosa</i>	18
<i>Thrudilla lineolata</i>	22

Pemurnian Bakteri

Hasil isolasi dan kultur bakteri yang telah diperoleh, selanjutnya dipisahkan dan ditumbuhkan kembali pada media yang baru, hal ini bertujuan untuk memastikan bakteri tersebut sudah murni. Koloni murni dapat ditandai dengan kesamaan bentuk, warna, ataupun ukuran dari bakteri

tersebut. Setelah proses pemurnian bakteri tersebut selesai, kemudian diamati pertumbuhannya untuk mendapatkan karakterisasi bakteri tersebut (Tabel 2). Untuk karakterisasi koloni bakteri ini dilakukan berdasarkan panduan dari buku "Microbiology Laboratory Manual" Varghese and Joy, 2014.

Tabel 2. Karakteristik morfologi isolat murni bakteri simbios *Phylidiella pustulosa* dan *Thrudilla lineolata*

Kode Isolat.	Gambar	Karakterisasi
PHP 01		Bentuk : Bundar Elevasi/ketinggian : Cembung Pinggiran : Bergelombang Warna : Putih Krem Kekeruhan: Buram

PHP 02



Bentuk : Tidak beraturan
 Elevasi/ketinggian : Menonjol
 Pinggiran : Bergelombang
 Warna : Putih krem
 Kekeruhan : Buram

THL 03



Bentuk : Tidak beraturan
 Elevasi/ketinggian : Menonjol
 Pinggiran : Lobate
 Warna : Kuning
 Kekeruhan : Tembus cahaya

Skrining Aktivitas Antibakteri dari Bakteri Simbion Nudibranch

Hasil isolasi yang telah diperoleh kemudian diuji aktivitas antibakterinya. Dalam hal ini dilakukan skrining aktivitas antibakteri dengan tujuan untuk mendapatkan isolat yang berpotensi

menghasilkan senyawa-senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri

patogen. Berikut pada Tabel 3 hasil skrining aktivitas antibakteri dari isolate murni bakteri simbion nudibranch *Phylidiella pustulosa* dan *Thrudilla lineolate*.

Skrining atau penapisan aktivitas antibakteri dari isolat bakteri selama 1x24 jam menunjukkan bahwa ketiga isolat yakni PHP 01, PHP 02 dan THL 03 memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus* (Tabel 4)

Tabel 4. Skrining Aktivitas antibakteri dari isolat murni terhadap *S. aureus* dan *E. coli*

Kode isolat	Bakteri uji	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
PHP 01	+	+
PHP 02	+	+
THL 03	+	+

Aktivitas antibakteri dilihat dengan adanya zona hambat atau *clear zone/inhibitory zone* pada sekitar isolat yang ditanam pada bakteri uji. Pengamatan hasil skrining aktivitas antibakteri dilakukan 1x24jam untuk mengetahui efek antimikroba yang terjadi pada masing-masing isolat bakteri.

Aktivitas antibakteri yang muncul pada skrining dapat dihubungkan dengan bakteri yang bersimbion dengan nudibranch tersebut. Beberapa penelitian antibakteri dari nudibranch menunjukkan hasil yang cukup baik, dimana senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh nudibranch mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji. Selain itu nudibranch mampu mensintesis metabolit sekunder dari bahan makanannya seperti Spons, Byrozoan, dan Coelenterata (Karunasagar *et al.*, 1999).

Karena memiliki kemampuan menghambat dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negative, maka diduga bahwa senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri yang bersimbion dengan nudibranch *Phylidiella pustulosa* dan *Thrudilla lineolata* termasuk berspektrum luas. Spektrum luas artinya senyawa tersebut bekerja aktif terhadap banyak jenis bakteri baik bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Sedangkan spektrum sempit artinya suatu senyawa bekerja aktif hanya terhadap satu golongan bakteri saja baik hanya pada bakteri gram positif ataupun hanya pada bakteri gram negatif (WHO, 2014).

KESIMPULAN

1. Dari Nudibranch *Phylidiella pustulosa* dan *Thrudilla lineolata* berhasil diisolasi 40 isolat bakteri simbion masing-masing 18 isolat dari *P.pustulosa* dan 22 isolat dari *T. lineolata*.

2. Skrining terhadap aktivitas antibakteri memperlihatkan isolat PHP 01, PHP 02, dan THL 03 memiliki kemampuan dalam penghambatan pertumbuhan bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus*,

DAFTAR PUSTAKA

- Gosliner, T. M., Valdes, A., Behrens, D. W. 2018. Nudibranch & Sea Slug Identification – Indo-Pacific – 2nd Edition
- Karunasagar, I., I. Karunasagar & A. Reilly. 1999. Aquaculture and Biotechnology. Science Publisher, Inc., USA, 102-111.
- Karuso, P., Scheuer P. J. 2002. Natural Products from Three Nudibranchs: *Nembrotha kubaryana*, *Hypselodoris infucata* and *Chromodoris petechialis*. *Molecules*, 7, 1-6.
- Nofianti, R. 2008. Urgensi dan Mekanisme Biosintesis Metabolit Sekunder Mikroba Laut. *Jurnal Natur Indonesia*. 10 (2): 120-125.
- Ompi, M. 2019. Nudibranchia (Gastropoda) Di Perairan Tropis Selat Lembeh, Sulawesi Utara : Ketahui sebelum Katastrophe. ISBN : 978-602-0796-25-3. Hal. 12, 28.
- Pringgenies D. 2009. Bioprospeksi Bakteri Simbion Dari Gastropoda *Conus miles* terhadap Strain Bakteri MDR (Multi Drug Resistant). *Ilmu Kelautan*. 14(1):42-49
- Pringgenies D. 2010. Karakteristik Senyawa Bioaktif Bakteri Simbion Moluska Dengan GC-MS. *J. Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 2(2):34-40
- Pringgenies. D dan M.C. Dananjoyo. 2011. Penapisan Bakteri Simbion Gastropoda *Stramonita armigera* Penghasil Senyawa Antibakteri Multi Drug Resistant Dari Perairan Ternate. *J. Natur Ind. (Wacana Sains Indonesia)* 13(3):200-206
- Pringgenies, D. dan P.P. Renta. 2014. Bakteri Simbion Gastropoda *Pleuroploca trapesium* Dari Perairan Ternate, Sebagai Alternatif Antibakteri MDR. *Ilmu Kelautan*.

- 19(1):55-62. doi: 10.14710/ik.ijms.19.1.55-62
- Proksch, P., R.A. Ebrada. Dan R. Ebel. 2002. Drugs From The Seas – Current Status and Microbiological Implications. *Appl. Microbiol. Biot.* 59: hal. 125-134.
- Reddy, K. W. R Mohanraju. N. K. Murthi. C. Ramesh. P. Karthick. 2015. Antimicrobial properties of nudibranchs tissues extracts from South Andaman, India. *Journal of Coastal Life Medicine.* Vol. 3 No. (7) : 582-584.
- Varghese, N. P. P. Joy. 2014. *Microbiology Laboratory Manual Book.* Kerala Agricultural University. India.
- WHO. 2014. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014.* World Health Organization. Hal. 257.