

Karakterisasi Molekuler Bakteri yang Berasosiasi dengan Penyakit BBD (*Black Band Disease*) pada Karang *Acropora* sp di Perairan Karimunjawa

Agus Sabdono^{1,2*} dan Ocky Karna Radjasa^{1,2}

¹Department of Marine Science, Diponegoro University, Semarang - 50275,

²Center for Tropical Coastal and Marine Studies, Diponegoro University

Telp. (024)-7474698; E-mail: agus_sabdono@yahoo.com

Abstrak

Black Band Disease (BBD) merupakan penyakit yang bersifat virulen terutama menyerang jenis karang batu. Meskipun komunitas bakteri BBD didominasi oleh jenis cyanobakterium, namun penelitian tentang jumlah komposisi bakteri yang menyusun komunitas belum pernah dilakukan. Komunitas bakteri yang berasosiasi dengan penyakit BBD (*black band disease*) pada karang cabang *Acropora* sp. dalam penelitian ini diuji dengan menggunakan teknik kultur dependent. Teknik molekuler gen 16S rDNA (amplifikasi 16S DNA ribosom) digunakan untuk karakterisasi komunitas secara komprehensif. Berdasarkan analisis sekuen gen 16S rDNA, data menunjukkan bahwa isolate BBD1 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Myroides odoratimimus* (99.0%), isolate BBD2 adalah *Bacillus algicola* (99.6%) dan isolate BBD3 adalah *Marine Alcaligenaceae* bacterium (96.0%). Hasil identifikasi bakteri yang berasosiasi dengan penyakit BBD pada karang cabang *Acropora* sp di Karimunjawa merupakan komunitas baru yang berbeda dengan hasil penelitian terdahulu. Hasil ini memungkinkan untuk dilakukan penelitian lanjutan tentang isolasi dan kultur bakteri tersebut untuk bisa menerangkan etiologi penyakit.

Kata kunci: *Black Band Disease (BBD)*, *Acropora* sp., 16S rDNA.

Abstract

Black band disease (BBD) is a virulent disease primarily affecting scleractinian corals. Eventhough the BBD bacterial mat is dominated by a cyanobacterium, the quantitative composition of the BBD bacterial mat community has not described previously. The bacterial community associated with black band disease (BBD) of the branching corals *Acropora* sp. in this study was examined using culture-dependent techniques. A complementary molecular techniques of 16S rDNA genes [amplified 16S ribosomal DNA] was used to give a comprehensive characterization of the community. On the basis of the results of sequen analysis, our data show that BBD1 isolate was closely related with *Myroides odoratimimus* (99.0%), BBD2 isolate was *Bacillus algicola* (99.6%) and BBD3 isolate was *Marine Alcaligenaceae* bacterium (96.0%). Of the three bacteria identified, these were not previously found in other studies. This result will allow the dominant BBD bacteria to be targeted for isolation and culturing experiments designed at interpreting the disease etiology.

Key words: *Black Band Disease*, *Acropora* sp., 16S rDNA.

Pendahuluan

Terumbu karang merupakan sumberdaya hayati bawah laut yang memiliki pesona karena keindahan estetikanya. Namun akhir-akhir ini timbul kekhawatiran akan kelestarian terumbu karang karena adanya penyakit-penyakit baru yang secara ganas menghancurkan sistem ekologi karang. Akibatnya fungsi rekreasi terusik karena pudarnya keindahan nilai estetika dan secara tidak langsung terjadi kerugian ekonomis karena adanya penurunan hasil tangkapan

ikan hias/lobster dan turisme. Untuk memahami situasi ini lebih baik, sangat penting untuk mempertimbangkan aspek ekologi dari terumbu karang, khususnya munculnya penyakit yang menyebabkan mortalitas karang karena adanya infeksi penyakit *Black Band Disease* (BBD) (Dinsdale, 1994). Penyakit karang BBD merupakan penyakit baru yang menginfeksi jaringan karang dengan daya serang sangat ganas menyebar secara global pada berbagai spesies karang (Rutzler and Santavy, 1983). Hampir 20% dari total luas terumbu karang di dunia diinfeksi

* Corresponding Author

oleh penyakit tersebut. Penyakit menyebar di antara koloni-koloni karang dan menghancurkan jaringannya, yang pada akhirnya menyebabkan mortalitas karang (Richardson, 1998). Pengamatan secara optikal menunjukkan adanya beragam jenis bakteri yang mengkoloni jaringan karang tersebut. Namun agen utama penyebab penyakit BBD tersebut adalah bakteri golongan *Cyanobacterium* (Edmunds, 1991). Littler and Littler (1996) melaporkan bahwa bakteri merupakan salah satu penyebab penyakit BBD pada karang, khususnya golongan *Cyanobacterium* seperti *Phormidium corallyticum*. Beberapa penelitian telah memfokuskan pada *P. corallyticum* (Kuta and Richardson, 1996; Richardson, 1996; 1998), namun hasilnya belum bisa membuktikan pemenuhan syarat sistematik postulat Koch bahwa *P. corallyticum* merupakan bakteri penyebab penyakit BBD. *P. corallyticum* menciptakan suatu pondasi kerjasama yang mendukung struktur BBD *mat* yang seolah-olah merupakan sebuah rumah yang kompleks dari 40 jenis bakteri yang secara filogenetik berbeda dari komunitas yang beragam (Frias-Lopez et al., 2002). Lebih lanjut dikatakan bahwa konsorsium mikrobial dari BBD *mat* 92 % berbeda dari komunitas bakteri yang berada pada badan air, jaringan karang sehat, dan permukaan karang yang mati.

Suatu fenomena yang telah diamati secara luas bahwa sel mikroba menempel secara kuat pada hampir semua permukaan benda padat yang terendam di lingkungan laut, lalu tumbuh, berkembang biak dan menghasilkan polimer ekstraseluler membentuk struktur lapisan yang disebut biofilm (Kierboe, 2003). Tidak terkecuali dengan permukaan karang, juga diketahui terdapat berbagai komunitas bakteri (Kim, 1994). Permukaan karang dilapisi oleh muco-polisakarida yang menunjang matrik kolonisasi bakteri didalam pembentukan komunitas bakteri pembentuk biofilm (Kushmaro et al., 1997).

Akhir-akhir ini banyak bakteri yang berasosiasi dengan karang telah dikarakterisasi sebagai sumber kimia bahan hayati laut (Moore, 1999), terutama setelah diketahui permukaan karang lebih kaya akan nutrisi daripada di sediment dan badan air (Unson et al., 1994). Karena lingkungan yang bersinggungan dengan bakteri pembentuk biofilm, diharapkan *indigenous* populasi mikroba lebih mampu beradaptasi untuk berkompetisi terhadap nutrisi dan ruang (Slattery et al., 2001). Informasi lebih lanjut menyebutkan bahwa bakteri-bakteri tersebut merupakan sumber metabolit sekunder untuk senyawa antibiotik baru.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkarakterisasi secara molekuler bakteri yang

berasosiasi dengan jaringan karang yang terinfeksi BBD.

Materi dan Metode

Sampling dan dokumentasi

Sampling karang dilakukan pada jaringan karang *Acropora sp* yang terinfeksi penyakit BBD di P. Kemujan, perairan Karimunjawa. Sampel kemudian dimasukkan dalam tas plastik polietilin (Whir-pak, Nasco, USA) dan ditempatkan dalam kontainer pendingin dan dibawa ke laboratorium. Dokumentasi karang dan jaringan karang yang terinfeksi dilakukan dengan *underwater camera* Canon 50S dan penyelaman scuba.

Isolasi dan purifikasi bakteri

Sampel karang selanjutnya dimasukkan ke dalam 9 ml air laut steril dan diencerkan hingga diperoleh pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} . Dari masing-masing pengenceran diambil 100 μ l dengan pipet ke dalam *half-strength* media ZoBell 2216 E yang telah disiapkan di dalam petri dish. Selanjutnya diratakan dengan menggunakan spreader dan diinkubasikan selama 2 x 24 jam pada suhu kamar. Isolasi dan purifikasi isolat bakteri dilakukan berdasar penampakan morfologis dengan metode goresan (*streak method*) hingga diperoleh kultur murni.

Ekstraksi dan amplifikasi DNA

Untuk analisis PCR, DNA genom dari strain BBD1, BBD2 dan BBD3 diekstraksi dari sel dengan cara mengambil sel bakteri dari plate agar, disuspensi dalam air steril (Sigma, Germany) dan diberi perlakuan fisik *freezing* (-70°C) dan *thaw* (95°C). Amplifikasi DNA-PCR total gen 16S rDNA dari ke-3 strain, purifikasi hasil PCR dan analisis sekuen dilakukan menurut metode dari Brinkhoff dan Muyzer (1997). PCR dilakukan dengan menggunakan Eppendorf Mastercycler (Eppendorf Inc. Germany) sebagai berikut: 2 ml template DNA, 40 pmol primer, 125 μ mol deoxyribonucleoside triphosphate, 5 ml 10 x RedTaqTM PCR buffer (Sigma, Germany), 1.2 mg ml⁻¹ (konsentrasi akhir) bovine serum albumin (Sigma) dan 0.75 unit RedTaqTM DNA polymerase (Sigma) diatur konsentrasi akhir hingga volume 50 ml dengan air steril (Sigma). PCR dilakukan 40 siklus dengan kondisi 1 menit pada 95°C , annealing 1 menit 70°C dan ekstensi selama 2 menit pada 72°C .

Sekuon gen 16S rDNA hasil amplifikasi PCR

Hasil amplifikasi PCR gen 16S rDNA dari strain BBD1, BBD2, dan BBD3 dipurifikasi. Kemudian analisis sekuensing dilakukan dengan metode dari Brinkhoff

dan Muyzer (1997). Hasil sekuen kemudian dianalisis homologinya dengan menggunakan BLAST database.

Analisis filogenetik

Hasil sekuen 16S rDNA dan beberapa referensi sekuen 16S rDNA dianalisis dengan menggunakan Clustal X. *Parsimony* digunakan untuk menghitung jarak matrik dan membangun pohon filogenetik dengan perangkat lunak PAUP (<http://www.lms.si.edu/>) (Swofford, 1998).

Hasil dan Pembahasan

Eksplorasi bakteri karang dan bakteri yang berasosiasi dengan penyakit BBD dilakukan dengan penyelaman scuba. Hasil dokumentasi karang yang terinfeksi penyakit BBD dapat dilihat pada Gambar 1. Dari gambar tersebut terlihat bahwa pita hitam menunjukkan adanya serangan penyakit BBD pada jaringan karang cabang *Acropora* sp. Richardson (1996) melaporkan bahwa penyakit BBD ditandai dengan adanya pita warna hitam dengan lebar antara 0,1-1 cm yang memisahkan secara jelas jaringan karang yang hidup dan skeleton.

Hasil isolasi bakteri dari jaringan karang yang terinfeksi BBD dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan penampakan morfologi koloni, 3 isolat bakteri berhasil diisolasi dari jaringan karang yang berasosiasi dengan BBD. Amplifikasi DNA dari 3 isolat bakteri asosiasi dengan BBD (BBD1, BBD2 dan BBD3) dilakukan dengan menggunakan primer ribosomal (F: posisi 8 sampai 27; dan 1500 R: posisi 1510 sampai 1492 dari penomoran 16S rRNA *E.coli*). Hasil amplifikasi DNA dapat dilihat pada Gambar 3. Gambar tersebut menunjukkan bahwa semua isolat menghasilkan *single band* (pita tunggal) dengan ukuran sekitar 1500 bp sesuai dengan perbandingan menggunakan marker DNA. Besarnya ukuran ini sesuai dengan ukuran yang diharapkan dari gen-gen 16S rRNA bakteri yaitu sekitar 1500-1600 bp.

Amplifikasi DNA dari isolat bakteri karang yang telah memperoleh pita tunggal menunjukkan bahwa primer yang digunakan merupakan primer yang spesifik untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA pada bakteri.

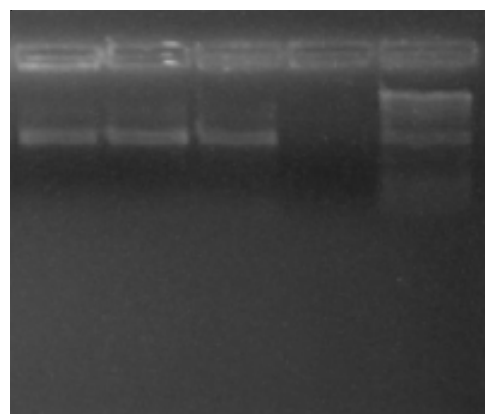
Perbandingan sekuen gen 16S rDNA dan konstruksi pohon filogenetik (Gambar 4) dari strain BBD1, BBD2 dan BBD3 dengan sekuen dari GeneBank menunjukkan bahwa strain strain ini mempunyai kekerabatan dekat dengan *Myroides odoratimimus* untuk strain BBD1, *Bacillus algicola* untuk strain BBD2 dan *Marine Alcaligenes bacterium* untuk strain BBD3. Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian yang



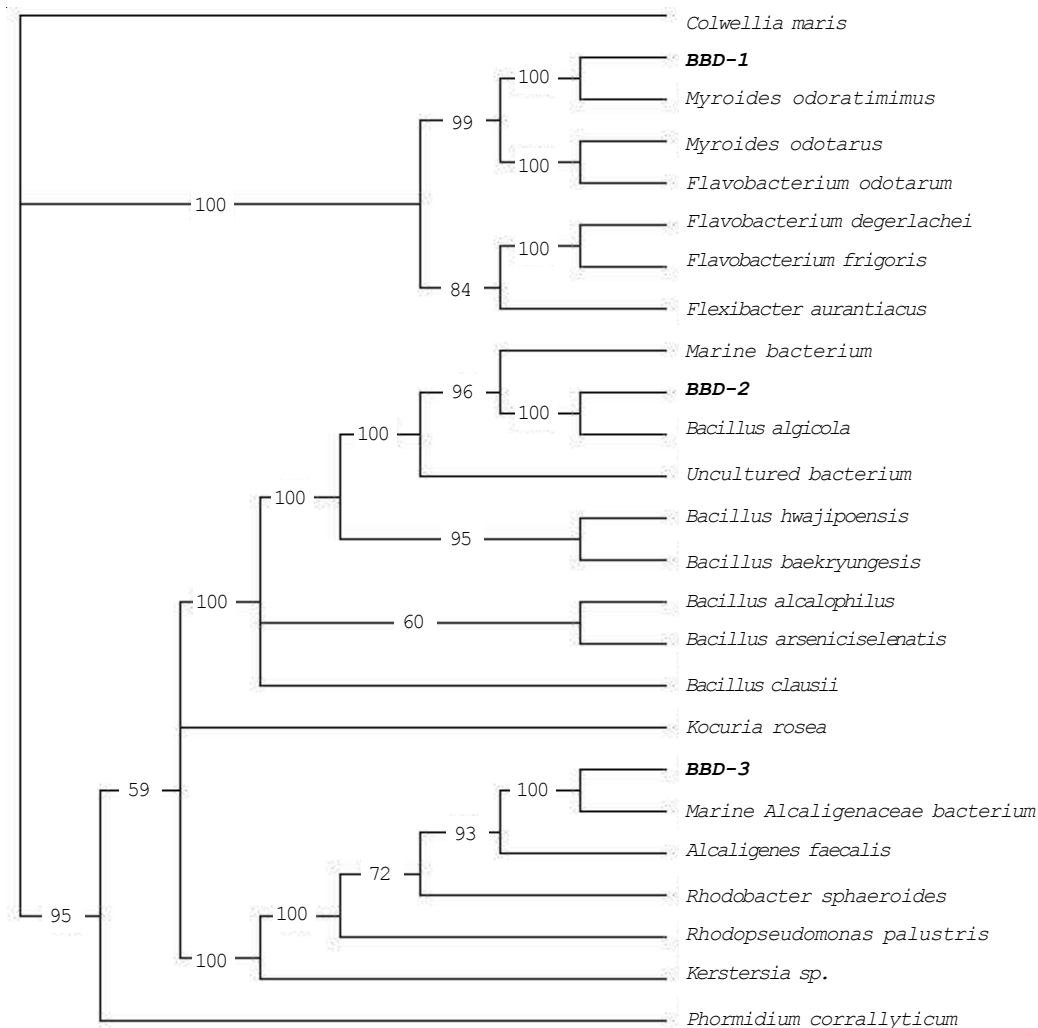
Gambar 1. Karang yang terinfeksi penyakit BBD di Karimunjawa



Gambar 2. Koloni bakteri yang berasosiasi dengan BBD



Gambar 3. Hasil amplifikasi DNA-PCR
(Keterangan: 1: BBD1; 2: BBD2; 3: BBD3 M: DNA Marker)



Gambar 4. Pohon filogenetik bakteri yang berasosiasi dengan penyakit karang BBD dan strain referensi dari database 16S rDNA. *Colwellia maris* digunakan sebagai outgroup.

dilakukan oleh Frias-Lopez et al. (2002) yang menemukan komunitas permukaan karang sehat (*brain-massive coral*) didominasi oleh *green sulfur bacteria*, α -*proteobacter*, *firmicutes* dan *planctomycetales*. Perbedaan jenis bakteri diduga karena perbedaan dari inang jenis karang yang berbeda. Lebih lanjut, Frias-Lopez et al. (2002) melaporkan bahwa setiap jenis karang memiliki keragaman mikroba yang berbeda. Komunitas bakteri yang diisolasi dari jaringan karang yang terinfeksi menunjukkan keragaman yang berbeda dengan bakteri karang sehat yaitu kelompok *Firmicutes* (5–26%), *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) (9–29%), γ -*proteobacteria* (17–35%), and δ -*proteobacteria* (2–15%). *Desulfovibrio* dan *Disulfobotus* sekuen terdeteksi pada ke tiga jenis karang yang digunakan sebagai materi penelitian (Frias-Lopez et al., 2002).

Kesimpulan

Bakteri *Myroides odoratimimus* strain BBD1, *Bacillus algicola* strain BBD2 dan *Marine Alcaligenaceae bacterium* strain BBD3 merupakan bakteri yang berasosiasi dengan BBD di perairan Karimunjawa. Hasil ini memberikan informasi baru tentang komunitas bakteri yang berasosiasi dengan penyakit BBD. Sehingga memungkinkan untuk dilakukan penelitian lanjutan tentang isolasi dan kultur bakteri tersebut untuk bisa menerangkan etiologi penyakit.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai dari Hibah Penelitian Dirjen DIKTI pada Program PENELITIAN DASAR (Contract. No. 16/P2IPT/DPFM/PID/III/2003).

Daftar Pustaka

- Brinkhoff T, Muyzer G. 1997. Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3789-3796.
- Dinsdale, E.A. (1994). Coral Disease on the Great Barrier reef Joint Scientific Conference. Queensland, 9-11 July.
- Edmunds, P. J. 1991. Extent and effect of black band disease on a Caribbean reef. *Coral Reefs* 10:161-165.
- Frias-Lopez, J., A. L. Zerkle, G. T. Bonheyo, and B. W. Fouke. 2002. Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2214-2228.
- Kim K. 1994. Antimicrobial activity in gorgonian corals (Coelenterata, Octocorallia). *Coral. Reefs.* 13: 75-80.
- Kiorboe T, Grossart HP, Ploug H, Kam T. 2003. Microbial dynamics on particles: colonization, growth, detachment, and grazing mortality of attached bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3036-3047
- Kushmaro A, Rossenberg E, Fine M, Loya Y. 1997. Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 147: 159-165
- Kuta, K., and L. L. Richardson. 1996. Abundance and distribution of black band disease of corals in the northern Florida Keys. *Coral Reefs* 15:219-223.
- Littler M.M. and D.S. Littler 1996. Black Band Disease in the South Pacific. *Coral Reefs* 15: 20
- Moore BS. 1999. Biosynthesis of marine natural products : microorganisms and macroalgae. *Nat. Prod. Rep.* 16: 653-674.
- Richardson, L.L. (1996) Horizontal and Vertical Migration Patterns of *Phormidium corallyticum* and *Beggiatoa* spp. Associated with Black Band Disease of Corals. *Microb. Ecol.* 32:323-335
- Richardson, L.L (1998) Coral Diseases:What is really Known? TREE vol. 13 no. 11:438-443
- Rutzler, K., and Santavy, D. 1983: The black band disease of Atlantic reef corals. I. Description of a cyanophyte pathogen. *P.S.Z.N.I.: Marine Ecology.* 4:301-319.
- Slattery M, Rajbhandari I, Wesson K. 2001. Competition-mediated antibiotic induction in the marine bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. *Microb. Ecol.* 41:90-96.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Copyright © Smithsonian Institution, 1998.
- Unson, M.D., Holland, N.D., and Faulkner, D.J. 1994. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of marine sponge and accumulation of the crystalline metabolites in the sponge tissue. *Mar. Biol.* 119: 1-11.