

Pengaruh Ekstrak Antifouling Bakteri Karang *Pelagibacter variabilis* Strain USP3.37 terhadap Penempelan Barnakel di Perairan Pantai Teluk Awur, Jepara

Agus Sabdono

Jurusan Ilmu Kelautan, FPIK, Universitas Diponegoro Semarang
Telp. (024)-7474698; E-mail: agus_sabdono@yahoo.com

Abstrak

Biofouling sebagai hasil dari proses penempelan organisme fouling pada berbagai struktur di lingkungan laut telah menimbulkan banyak kerugian bagi pelaku industri kelautan. Aplikasi cat pelindung antifoulant komersial yang komponen utamanya adalah logam berat seperti, TBT (tri-n-butyl tin), tembaga, telah berkembang menjadi masalah baru sehingga memerlukan cat pelindung yang ramah lingkungan.. Bakteri yang berasosiasi dengan organisme di lingkungan laut diketahui menghasilkan metabolit sekunder sebagai sumber senyawa alternatif antifoulant. Bakteri *Pelagibacter variabilis* USP3.37 digunakan sebagai bahan ekstrak kasar yang diformulasikan dengan cat untuk uji mikro fouling dan makro fouling di lapangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar *P. variabilis* USP3.37 mempunyai aktifitas antifouling terhadap bakteri fouling. Pada uji makro fouling menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar tanpa campuran cat mampu menurunkan jumlah penempelan barnakel. Terlihat adanya pola semakin tinggi konsentrasi ekstrak kasar semakin meningkatkan aktivitas antifouling. Berdasarkan karakter fenotip tersebut, bakteri *P. variabilis* USP3.37 dapat digunakan sebagai organisme probiotik untuk antifouling di dalam menghilangkan penempelan bakteri pada biofilm.

Kata kunci : antifouling, *Pelagibacter variabilis* USP3.37, barnakel

Abstract

Marine biofouling, despite a natural process as a result of organism growth on underwater surfaces that causes huge economic losses to marine industries. Problems with heavy metal antifouling compounds, such as, TBT, copper have highlighted the need to develop new environmentally friendly antifouling coatings.

Bacteria isolated from living surfaces in the marine environment are a promising source of natural antifouling compounds. *Pelagibacter variabilis* USP3.37 used to produce crude extract that was formulated with coating paints for micro fouling and macro fouling assay in the field. The results showed activity against a test panel of fouling bacteria. Further tested for their ability to inhibit the settlement of barnacle caused a decrease in the number of settled barnacles on crude extract without containing paint. The activity pattern showed that the more the crude extract, the higher the antifouling activity. This phenotype is important for the bacterium's use as a probiotic organism for novel antifouling or removing bacteria attached in a biofilm.

Key words : antifouling, *Pelagibacter variabilis* USP3.37, barnacle

Pendahuluan

Biofouling sebagai hasil dari proses penempelan organisme fouling pada berbagai struktur di lingkungan laut telah menjadi suatu permasalahan besar bagi pelaku industri kelautan. Penempelan oleh organisme fouling telah menyebabkan kerugian yang besar serta memperpendek masa pakai dari berbagai struktur di laut seperti kapal, dermaga, pancang maupun struktur penyangga pengeboran lepas pantai. Hal ini menjadi semakin serius ketika proses penempelan oleh organisme fouling tersebut juga mengakselerasi proses

biokorosi serta kerusakan struktur kayu karena aktivitas "wood borers".

Di lingkungan laut, mikroorganisme terutama bakteri yang mengkolonisasi berbagai permukaan struktur, memperburuk keadaan dengan membentuk biofilm primer, yang diketahui merupakan prasyarat bagi penempelan dan metamorphosis dari organisme penempel, seperti diatom, spora alga dan hewan avertebrata teritip/barnacle. Interaksi biologi di antara organisme yang berasosiasi dengan permukaan struktur tersebut memiliki suatu peranan yang besar di dalam

pengembangan dan pemeliharaan komunitas *biofouling*. Banyak *sessile* alga dan hewan laut yang meningkatkan mekanisme pertahanannya terhadap *fouling* dengan memproduksi senyawa metabolit yang dapat mempengaruhi penempelan, pertumbuhan dan *survival* dari organisme lain (Mizobuchi, 1996). Namun, alga dan hewan laut tersebut belum cukup memiliki pertahanan secara kimia, sehingga pertahanan non-kimia terhadap *fouling* seperti pengelupasan kulit permukaan sering dilakukan. Sistem pertahanan komunitas *fouling* sangat tergantung pada metabolit sekunder yang diproduksi oleh bakteri yang berasosiasi dengan permukaan (Holmstrom et al., 1992). Permukaan film dari bakteri *fouling* mempunyai peranan penting dalam proses penempelan (*settlement*) dan metamorfosis dari beberapa larva avertebrata. Terdapat hubungan yang kompleks antara film bakteri dan penempelan larva, dimana bakteri memiliki faktor yang menstimulus penempelan larva (Maki dan Mitchell, 1988).

Aplikasi cat pelindung antifoulant komersial yang komponen utamanya adalah logam berat telah berkembang menjadi masalah baru selain proses *biofouling* itu sendiri. Pemanfaatan *antifoulant* komersial tersebut makin meluas seiring dengan perkembangan industri kelautan, yang secara langsung maupun tidak langsung akan meningkatkan kandungan bahan pencemar logam berat di lingkungan laut. Seiring dengan meningkatnya kesadaran masyarakat tentang lingkungan laut, maka penerapan logam berat sebagai cat pelindung dipandang dapat menyebabkan suatu pencemaran logam berat di lingkungan laut. Hal ini terjadi karena logam berat sebagai komponen utama senyawa *antifoulant* akan terlarut ke dalam perairan laut seiring dengan waktu penggunaan dari cat pelindung tersebut.

Metabolit sekunder yang disintesis oleh bakteri laut yang merupakan produk hayati laut (*marine natural products*) merupakan alternatif bagi sumber senyawa *antifoulant* baru yang bersifat tidak toksik bagi lingkungan laut. Egan et al. (2001a) melaporkan bahwa bakteri laut *Pseudoalteromonas tunicata* dan *Pseudoalteromonas ulvae* (Egan et al., 2001b) mensintesis senyawa *antifoulant*.

Pencarian alternatif bagi aplikasi senyawa *antifoulant* yang berbasis logam berat sudah menjadi kebutuhan yang sangat mendesak. Penanganan *biofouling* di lingkungan laut serta pemanfaatan senyawa *antifoulant* yang ramah lingkungan telah menjadi pekerjaan rumah yang harus segera ditangani secara multidisiplin dan serius. Penelitian ini

melaporkan uji lapangan (*field experiment*) ekstrak kasar dari bakteri karang *Pelagibacter variabilis* UPS3.37 terhadap penempelan teritip/barnakel di perairan Teluk Awur, Jepara.

Materi dan Metode

Materi penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari – Mei 2006 di perairan pantai Teluk Awur, Jepara. Bakteri karang *P. variabilis* UPS3.37 yang diisolasi dari karang lunak *Sarcophyton* sp. di P. Peucang, Ujung Kulon digunakan sebagai materi penelitian (Sabdono dan Radjasa, 2006).

Preparasi ekstrak kasar antifouling

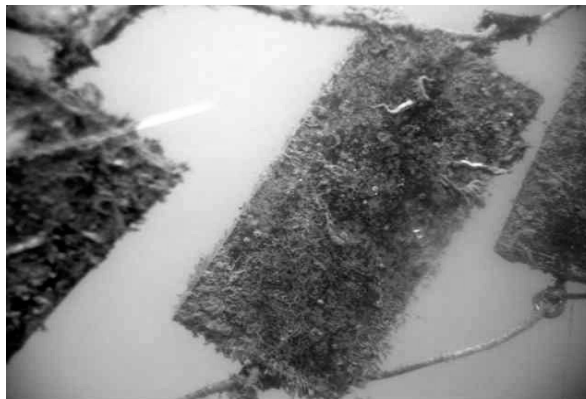
Proses persiapan kultur bakteri *P. variabilis* UPS3.37 pada penelitian ini mengacu pada prosedur yang dilakukan oleh Burgess et al. (2003). Isolat murni bakteri yang telah dikultur dalam media agar miring diambil masing-masing satu ose untuk dikultur dalam 8 (delapan) tabung biakan yang masing-masing berisi 25 ml media Zobell 2216E cair sebagai langkah pemerataan *starter* bakteri, yang kemudian di *shaker* selama 48 jam. Kemudian kultur pada setiap biakan dipindahkan ke dalam 475 ml media Zobell 2216E sehingga didapat 500 ml kultur massal bakteri. Kultur massal kemudian di *shaker* selama 120 jam. Kultur massal dipanen dan disentrifuge (2500 rpm) selama 1 jam. Supernatan yang didapat kemudian diekstraksi dalam *separator funnel* dengan pelarut metanol, dengan perbandingan supernatan dan pelarut (1 : 1). Fraksi metanol kemudian diambil dan dikisatkan dengan *rotavapour* pada suhu 60 °C. Ekstrak kasar (pasta) yang didapat kemudian ditimbang beratnya.

Uji microfouling ekstrak kasar

Tes uji hambatan pertumbuhan dilakukan antara isolat *P. variabilis* UPS3.37 terhadap bakteri pembentuk biofilm dengan menggunakan metoda *overlay*. Isolat *P. variabilis* UPS3.37 diinokulasikan ke permukaan medium agar Zobell 2216E. Petri tersebut akan diinkubasikan selama 2 hari pada suhu ruangan. Satu persen kultur (v/v) dari setiap target bakteri pembentuk biofilm pada fase logaritma (ca. 10⁹ sel ml⁻¹) akan dicampur dengan soft agar yang kemudian akan dituangkan pada agar media yang sebelumnya telah diinokulasi isolat *P. variabilis* UPS3.37. Petri akan diinkubasikan pada suhu ruang selama 48 jam. Aktivitas antifouling akan ditentukan oleh adanya pembentukan zona hambatan di sekeliling isolat *P. variabilis* UPS3.37.



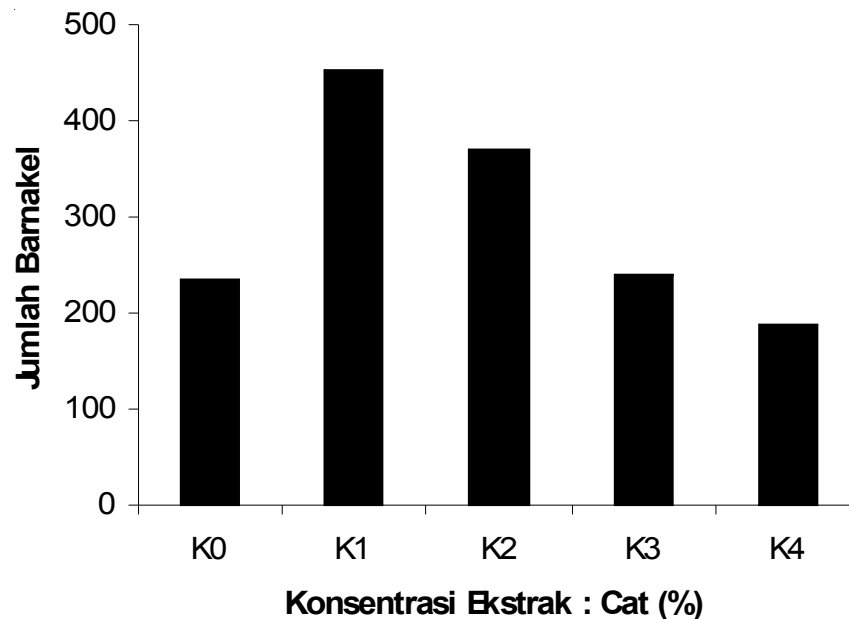
Gambar 1. Uji microfouling bakteri *Pelagibacter variabilis* UPS3.37



Gambar 2. Uji makrofouling pada kedalaman 50 cm dibawah surut terendah



Gambar 3. Organisme penempel barnakel pada panel kayu



Gambar 4. Jumlah barnakel pada berbagai konsentrasi ekstrak kasar (Keterangan: K0 : kontrol; K1: 25% ekstrak:75% cat; K2: 50% ekstrak:50% cat; K3: 75% ekstrak: 25% cat; K4: 100% ekstrak)

Uji macrofouling ekstrak kasar

Uji lapangan dilakukan dengan mencampur cat dan senyawa aktif dari ekstrak kasar bakteri asosiasi untuk mengetahui kemampuan senyawa aktif dalam melindungi struktur dari penempelan organisme fouling. Disiapkan beberapa balok kayu berukuran 7 x 14 cm dan dibuat lubang kecil pada salah satu ujungnya untuk memasukan tali pengikat. Dibuat beberapa larutan ekstrak kasar dan cat dengan perbandingan (25:75; 50:50; 75:25; 10: 0). Satu balok tanpa penambahan ekstrak aktif akan digunakan sebagai kontrol. Selanjutnya larutan campuran tersebut digunakan untuk mengecat panel kayu yang tersedia. Setelah dikeringkan selama 3 hari, maka kayu tersebut akan diikat dengan tali plastik dan dipasang pada tiang penyangga demaga di laut. Balok kayu tersebut ditempatkan 50 cm dibawah permukaan laut pada surut terendah selama 35 hari. Kemudian dihitung jumlah barnakel yang menempel.

Hasil dan Pembahasan

Hasil uji *microfouling* ekstrak kasar isolat *P. variabilis* UPS3.37 terhadap bakteri primer pembentuk biofilm dapat dilihat pada Gambar 1. Dari gambar tersebut terlihat adanya pembentukan zona hambatan pertumbuhan bakteri pembentuk biofilm. Hal ini menunjukkan adanya aktivitas antifouling dari

ekstrak kasar bakteri tersebut yang dapat dilanjutkan pada uji *macrofouling* di lapang. Langkah pertama di dalam pengembangan biofilm adalah adsorpsi makromolekul organik untuk membuat kondisi yang memungkinkan pembentukan film/lapisan. Kondisi tersebut kemudian diikuti oleh penempelan bakteri dan organisme sel tunggal lainnya. Dikatakan bahwa penghambatan pembentukan biofilm secara efektif pada langkah awal ini adalah kurangnya kondisi karakteristik permukaan struktur yang diperlukan larva barnakel untuk menempel (Satuito *et al.*, 1997; Wieczorek and Todd,1997). Oleh karena itu, pengembangan suatu cat dengan aktivitas antibakteri mungkin dapat mengganggu tahap awal pengembangan biofilm, dan menyediakan suatu pelapisan *antifouling* yang efektif untuk perlindungan struktur di laut.

Hasil uji *macrofouling* penempelan barnakel dapat dilihat pada Gambar 2, 3 dan 4. Dari Gambar 4 tersebut terlihat bahwa ekstrak kasar bakteri *P. variabilis* UPS3.37 menunjukkan aktivitas antifouling pada perlakuan pemberian ekstrak kasar tanpa campuran cat dengan terjadinya pengurangan jumlah penempelan barnakel. Hasil ini berbeda dengan laporan hasil penelitian terdahulu yang melaporkan bahwa aktifitas antifouling kebanyakan hanya berasal dari genus *Bacillus* dan *Pseudomonas*. Hasil tersebut diduga hanya

merupakan refleksi metode kultur yang digunakan daripada indikasi keragaman spesies pada permukaan film (Burgess *et al.*, 2003).

Meskipun pada konsentrasi ekstrak lainnya tidak menunjukkan adanya aktivitas antifouling, namun dari Gambar 4 tersebut terlihat adanya trend/pola penurunan jumlah organisme penempel pada kayu dengan semakin meningkatnya jumlah pemberian ekstrak kasar. Diduga perbedaan respon yang diberikan pada setiap perlakuan terhadap jumlah penempelan barnakel karena adanya perbedaan kuantitas dan laju pelepasan senyawa aktif antifouling dari ekstrak. Burgess *et al.* (2003) menyatakan bahwa pada saat ekstrak diberikan bersama-sama dengan cat akan memberikan laju pembebasan senyawa aktif ke permukaan cat dengan kecepatan yang berbeda dan memiliki perbedaan aktivitas terhadap cakupan target organisme. Holmstrom dan Kjelleberg (1999) mempelajari secara detail tentang aktivitas antifouling pada bakteri *P. tunicata* yang diisolasi dari tunicata *Ciona intestinalis* menghasilkan 5 jenis senyawa ekstraselular yang dapat menghambat penempelan atau perkembangan spesies yang mengkolonisasi permukaan. Senyawa yang belum diidentifikasi ini menghambat penempelan hewan avertebrata, spora alga, pertumbuhan bakteri dan jamur serta diatome. Uji di lapangan biasanya memberikan hasil yang kurang signifikan yang diduga kejadian ini disebabkan oleh terlalu cepatnya senyawa aktif terlepas dari cat (*leached*), sehingga aktivitas antifouling dari ekstrak hilang dalam waktu yang singkat. (Matsumura *et al.*, 2000).

Kesimpulan

Dalam penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar antifouling bakteri *P. variabilis* UPS3.37 dapat menurunkan jumlah penempelan barnakel. Aktivitas antifouling terjadi pada pemberian ekstrak kasar tanpa campuran cat dan diharapkan fenotip ini dapat digunakan sebagai probiotik untuk senyawa baru antifouling di dalam mencegah penempelan bakteri pembentuk biofilm.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai dari Hibah Penelitian Dirjen Dikti pada Program Penelitian Hibah Bersaing No. 031/SPPP/PP/DP3M/IV/2005.

Daftar Pustaka

Burgess, J. G., K.G. Boyd, E. Armstrong, Z. Jiang, L.

Yan, M. Berggren, U. May, T. Pisacane, A. Granmo, and D.R. Adams. 2003. The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling* 19: 197-205.

Egan, S., C. Holmström, and S. Kjelleberg. 2001a. *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1499-1504.

Egan, S., S. James, C. Holmström, and S. Kjelleberg. 2001b. Inhibition of algal spore germination by the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35:67-73.

Holmström, C., D. Rittschof, and S. Kjelleberg. 1992. Inhibition of attachment of larval barnacles, *Balanus amphitrite* by *Ciona intestinalis* a surface colonizing marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2111-2115.

Holmström, C. and S. Kjelleberg. 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30:285-293.

Maki, J.S. and R. Mitchell 1988. Microbial surface film and their influence on larval settlement and metamorphosis in the marine environment. In: Marine biodeterioration: Advanced techniques applicable to the Indian Ocean. A.A. Balkema, Rotterdam.

Matsumura K., J. M. Hills, P. O. Thomason, J. C. Thomason, A. S. Clare. 2000. Discrimination at settlement in barnacles: laboratory and field experiments on settlement behaviour in response to settlement-inducing protein complexes. *Biofouling* 16:181-190

Mizobuchi, S., K. Abachi, and W. Miki. 1996. Antifouling polyhydroxysterols isolated from a Palauan octocoral of *Simularia* sp. *Fish. Sci.* 62:98-100.

Sabdono, A. and O.K. Radjasa 2006. Antifouling activity of bacteria associated with soft coral *Sarcophyton* sp. Against marine biofilm-forming bacteria. *J. Coast. Dev.* 10: 55-62.

Satuito C. G., K. Shimizu and N. Fusetani. 1997. Studies on the factors influencing larval settlement in *Balanus amphitrite* and *Mytilus galloprovincialis*. *Hydrobiologia* 358: 275-280

Wieczorek S K, Todd C D (1997) Inhibition of bryozoan and ascidian settlement by natural multispecies biofilms: effects of film age and the roles of active

and passive algal attachment. *Mar. Biol.* 128: 463-473