

Bakteri Simbion Gastropoda *Pleuroploca trapezium* Dari Perairan Ternate, Sebagai Alternatif Antibakteri MDR

Delianis Pringgenies* dan Person Pesona Renta

Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. H. Prof. Sudarto, SH, Tembalang, Semarang, Indonesia 50275
Email: pringgenies@yahoo.com

Abstrak

Bakteri yang resisten terhadap beberapa jenis antibakteri ini dikenal dengan bakteri multi drug resistant (MDR). Untuk mengatasi permasalahan tersebut, perlu dilakukan pencarian senyawa antibiotik baru yang lebih efektif dan efisien dalam mengatasi permasalahan bakteri MDR. Penelitian bertujuan untuk mengetahui potensi bakteri yang bersimbiosis dengan gastropoda *Pleuroploca trapezium* sebagai sumber antibakteri MDR. Sampel Moluska dikoleksi dari perairan Ternate, Maluku. Tahapan penelitian meliputi isolasi bakteri, skrining bakteri simbion yang potensi sebagai anti bakteri MDR, uji antibakteri, isolasi bakteri patogen klinis MDR; uji sensitivitas antibakteri, ekstraksi, amplifikasi dan sekuensing DNA. Hasil 16S urutan r-DNA dianalisis dan diedit menggunakan program Genetix dan diikuti dengan analisis urutan 16S rDNA. Hasil menunjukkan bahwa terdapat 19 isolat bakteri dengan 5 bakteri aktif yang berasosiasi dengan *Pleuroploca trapezium*. Berdasarkan besarnya zona hambat yang dibentuk dan konsistensi munculnya zona hambatan, isolat terbaik adalah TPT 4.7. Isolat ini memiliki hubungan yang dekat dengan *Paracoccus* sp. MBIC4019 dengan homologi sebesar 95% yang menunjukkan kekerabatan ditingkat genus. Hasil penelitian ini memberikan harapan adanya potensi besar sebagai bahan antibakteri baru.

Kata kunci: antibakteri, simbion, *Pleuroploca trapezium*, multi drugs resistant

Abstract

Bacterial Symbiont Gastropoda *Pleuroploca trapezium* from Ternate, as Alternative Antibacterial MDR

The bacteria resistant to some antibiotics are known as multi drug resistant (MDR). To overcome the problem, it is needed to search for a new antibiotic compounds more effectively and efficiently. This study aims to identify potential from symbionts of *Pleuroploca trapezium* as a source of antibacteria MDR and identifying the bacteria that were active against the MDR. Samples were collected from Ternate, Maluku. Isolation of symbiotic bacteria, screening for bacteria which producing secondary metabolites as anti-MDR bacteria, antibacterial test, isolation of clinical pathogenic bacteria of MDR. Conducting anti-bacterial sensitivity test, sensitivity test for antibacterial, DNA extraction, DNA amplification based on PCR method, DNA sequencing. Result of 16S r-DNA sequence was then analyzed and edited using GENETYX program and followed by 16S rDNA sequence analysis. Screening of bacteria associated with *P. trapezium* resulted in 19 isolates with 5 active bacteria. Based on the size of the zone forming and the consistency of zone, so the best isolate is TPT 4.7. The identification shows that TPT 4.7 has a close relationship with the *Paracoccus* sp. MBIC4019 with homologi of 95%, which shows the relationship at the genus level. Its suggest that these results are very promising as a new antibacterial material.

Keywords: antibacterial, symbiotic bacteria, *Pleuroploca trapezium*, multi drugs resistant

Pendahuluan

Antibiotik adalah senyawa alami maupun sintetik, yang mempunyai efek menekan atau menghentikan suatu proses biokimia di dalam organisme, khususnya dalam proses infeksi oleh

bakteri (Irianto, 2006). Antibiotik telah terbukti bermanfaat bagi penyembuhan penyakit infeksi, namun mikroorganisme penyebab infeksi memiliki kemampuan untuk beradaptasi terhadap toksisitas antibiotik sehingga menjadi resisten (Dwiprahasto, 2005; Utami, 2011). Selain itu penggunaan

antibiotik yang tidak terkontrol dapat menyebabkan resistensi, dan transfer resistensi secara horisontal ke patogen lain melalui transfer gen (Suwandi, 1992). Brooks *et al.* (2001) menerangkan bahwa resistensi bakteri terhadap antibiotik memiliki beberapa mekanisme, yaitu bakteri menghasilkan enzim yang merusak antibiotik, bakteri mengubah struktur target untuk antibiotik serta bakteri memperbesar produksi bahan metabolit. Resistensi bakteri patogen diketahui tidak hanya satu jenis saja, melainkan terhadap beberapa jenis antibiotik. Bakteri yang resisten terhadap beberapa jenis antibiotik dikenal dengan bakteri *multi drug resistance* (Dijkshoorn, 2007).

Antibiotik yang digunakan pada saat ini sebagian besar berasal dari mikroorganisme darat (Kelecom, 2001). Beberapa kelompok bakteri sudah mengalami resistensi terhadap antibiotik yang berasal dari mikroorganisme darat seperti ampicillin, penisilin, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, imipenem, dan vancomycin (Dwiprahasto, 2005). Mengingat 70 % permukaan bumi ditutupi oleh lautan, maka perlu adanya eksploitasi terhadap kekayaan laut sebagai antibiotik. Laut memiliki biodiversitas yang tinggi dan tentunya merupakan aset besar yang berpotensi untuk dimanfaatkan (Sukara, 2006). Salah satunya adalah kelompok dari hewan invertebrata laut seperti gastropoda. Gastropoda jenis *P. trapezium* merupakan salah satu jenis moluska yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang berpotensi untuk dikembangkan (Cimino dan Gavagnin, 2006).

Senyawa bioaktif adalah senyawa metabolit sekunder yang biasanya terdapat pada organisme yang dalam kadar kecil sudah mampu mempengaruhi fungsi fisiologis sel hidup. Sedangkan pengertian metabolit sekunder itu sendiri merupakan senyawa yang disintesa oleh suatu organisme bukan untuk memenuhi kebutuhan dasarnya tetapi untuk mempertahankan eksistensinya dalam interaksinya dengan ekosistem. Metabolit sekunder berperan pada kelangsungan hidup suatu spesies dalam perjuangan menghadapi organisme lain. Seperti untuk mempertahankan diri dari predator, penarik seks dan feromon. Pada umumnya metabolit sekunder tidak diproduksi pada fase percepatan pertumbuhan (*tropofase*), namun dibentuk pada fase perlambatan pertumbuhan (*indofase*). Metabolit sekunder yang dihasilkan dapat berfungsi sebagai penghambat dan pelindung terhadap predator, zat allelopati (zat yang dihasilkan oleh suatu organisme yang mempunyai efek organisme lain tidak hidup disekelilingnya) dan sebagai senyawa antifauling. Umumnya metabolisme sekunder menghasilkan senyawa-senyawa seperti terpena, alkaloid dan karotenoid.

Untuk mengatasi penyakit infeksi yang muncul akibat dari bakteri yang sudah resisten terhadap antibiotik maka, perlu dilakukan pencarian senyawa antibiotik baru yang lebih efektif dan efisien dalam mengatasi permasalahan bakteri *Multi Drug Resistant* (MDR). Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mencari senyawa baru, seperti Ahmad dan Beg (2001), Radjasa *et al.* (2007), Pringgenies (2009) dan Harmawan *et al.* (2012). Berbagai pendekatan telah dilakukan untuk mendapatkan senyawa antibiotik yang baru, salah satunya adalah dengan mencari senyawa bioaktif dari mikroorganisme yang bersimbiosis dengan invertebrata laut, yakni moluska dari kelas Gastropoda jenis *P. trapezium* yang memiliki aktivitas antibakteri MDR. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi bakteri yang bersimbiosis dengan *P. trapezium* sebagai antibakteri MDR dan identifikasi bakteri yang bersimbiosis dengan *P. trapezium* yang mempunyai aktivitas terhadap beberapa strain bakteri MDR.

Materi dan Metode

Isolasi bakteri

Pleuroploca trapezium diperoleh dari perairan Ternate, kemudian dimasukkan dalam tas plastik polietilen (Whir-pak, Nasco, USA) dalam cool box. Sampel diambil 1 gr selanjutnya dimasukkan ke dalam 9 ml air laut steril dan diencerkan hingga diperoleh pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} . Dari masing-masing pengenceran diambil 100 μ l dengan pipet ke dalam media Actinomycetes yang telah disiapkan di dalam petri dish. Selanjutnya diratakan dengan spreader dan diinkubasikan selama 2 x 24 jam pada suhu kamar. Pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan metode goresan hingga diperoleh kultur murni.

Skrining bakteri penghasil senyawa anti-MDR

Tes uji hambatan pertumbuhan dilakukan antara isolate bakteri dari Moluska kelas Gastropoda jenis *P. trapezium* terhadap bakteri MDR dengan metoda overlay. Setiap isolat diinokulasikan ke permukaan medium agar. Sebanyak 12 isolat ditempatkan dalam 1 cawan petri. Petri tersebut diinkubasikan selama 4 hari pada suhu ruangan. Satu persen kultur (v/v) dari setiap target bakteri MDR pada fase logaritma (ca. 10^9 sel mL^{-1}) dicampur dengan soft agar yang kemudian dituangkan pada agar media yang telah dinokulasi isolat dari moluska kelas Gastropoda jenis *P. trapezium* sebelumnya. Petri diinkubasikan pada suhu ruang selama 48 jam. Aktivitas antibakteri ditentukan oleh adanya formation zona hambatan di sekeliling isolat moluska.

Uji antibakteri moluska

Jaringan moluska kelas Gastropoda jenis *P. trapezium* dihancurkan dengan blender dan selanjutnya diekstraksi dengan cara homogenisasi dengan pelarut Hexane (non polar) dan 10% methanol dalam khloroform (polar) menggunakan blender. Campuran organik yang diperoleh kemudian difiltrasi menggunakan vacuum filter. Filtrat kemudian dipisahkan dari pelarut dengan rotary evaporator. Selanjutnya ekstrak diujikan strain MDR dengan metode difusi agar. Aktivitas antibakteri ditentukan dengan ada tidaknya zona hambatan yang terbentuk.

Isolasi bakteri patogen klinik (MDR)

Berbagai spesimen klinis (darah, feses, urine, dll) didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Klinik, Rumah Sakit Kariadi/FK UNDIP Semarang yang terdiri dari jenis bakteri *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, CNS dan *Enterobacter* sp. Sampel bakteri MDR dikultur pada medium Nutrient Agar, Mac Conkey dan medium Blood agar, CHROM agar *S. aureus* dan CHROM agar MRSA (ITK Diagnostic). Setelah 18-24 jam inkubasi pada suhu 37°C. Untuk preparasi inoculum, isolasi bakteri disuspensi dalam air garam steril, sehingga turbiditas tampak mencapai 0.5 standar McFarland standard. Suspensi bakteri langsung digunakan untuk uji difusi.

Uji sensitivitas antibakteri

Metode difusi disk dengan acuan CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute/ NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005). Briefly, spensi bakteri disebarkan pada permukaan agar Mueller-Hinton (Oxoid). Disk antibiotik (Oxoid) diletakkan diatas permukaan agar Mueller- Hinton. Inkubasi bakteri dilakukan setelah 24 jam pada suhu ruangan 35°C, zona hambatan diukur menggunakan jangka sorong dalam satuan millimeter. Kategori sensitivitas bakteri (*sensitive, intermediate susceptible or resistant*) ditentukan dengan membandingkan dengan diameter yang direkomendasikan oleh CLSI/NCCLS. Hasil uji sensitivitas dipantau dengan kontrol kualitas strains jenis *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Coagulase Negative Staphylococcus* dan *Enterobacter* sp.

Uji kepekaan terhadap antimikroba

Uji kepekaan terhadap antimikroba dilakukan dengan metode disk diffusion sesuai dengan National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS). Disiapkan media Muller Hinton (MH) agar plate. Selanjutnya dibuat suspensi kuman

dalam NaCl steril hingga sesuai dengan standard kekeruhan 0.5 Mac Farland. Suspensi bakteri disebarkan pada medium MH agar plate dengan lidi kapas steril. Disk antibiotik selanjutnya diletakkan pada permukaan agar. Inkubasi 37°C selama 18-24 jam. Kemudian diukur zona hambatan yang terbentuk setiap disk antibiotik dengan kaliper (mm). Standard NCCLS selanjutnya digunakan untuk menginterpretasikan hasil dalam kategori susceptible/ sensitif, intermediate dan resisten. Strain kontrol yang digunakan adalah jenis *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, CNS dan *Enterobacter* sp.

Ekstraksi dan amplifikasi DNA

Isolat bakteri terpilih dikultur pada 50 ml medium cair ZoBell 2216E pada suhu 20°C selama 24 jam, kemudian dipanen dengan sentrifugasi, dan selanjutnya dicuci dan disuspensi dengan akuades steril. Ekstraksi DNA dilakukan dengan mencampurkan 40 µl suspensi bakteri, 10 µl Proteinase K (1 mg.mL⁻¹) (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) dan 50 µl 2 X buffer. Campuran dipanaskan pada suhu 60°C selama 20 menit dan 100°C selama 10 menit. Setelah itu didinginkan secara cepat dalam es selama 10 menit dan disentrifugasi selama 5 menit pada 8000 rpm (Sabdo, 2001).

Amplifikasi DNA dilakukan dengan metode PCR dan primer yang digunakan adalah (Forward: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; posisi 8-27 dan 1500 Reverse primer: 5'-GGTTACCTTGTTAC GACTT-3'; posisi 1510-1492 berdasarkan penomoran 16S rRNA *E. coli*) menurut Weisburg et al. (1991). Amplifikasi DNA dengan PCR dilakukan dengan DNA thermal cycler (Mini cycler TM, MJ Research Inc, Watertown, MA, USA) dengan perlakuan temperatur sebagai berikut: Denaturasi awal pada 94 °C selama 2 menit, kemudian 30 siklus denaturasi (94°C selama 2 menit), annealing (45°C; 2 menit), dan ekstensi (72°C; 2 menit), serta ekstensi terakhir pada 72°C; 3 menit. Elektroforesis dilakukan dengan cara memasukkan 1 µl alikuot produk PCR ke dalam sumur gel 1% gel agarosa yang diletakkan pada buffer 50X TAE, kemudian diamati apakah DNA telah teramplifikasi dengan baik.

Sekuensing DNA

Hasil amplifikasi PCR dipurifikasi dan dikonsentrasikan menggunakan Microcon-100 micro concentrator (Amicon, Beverly, MA, USA). Reaksi sekuen gen 16S rDNA disiapkan dengan *SequiTherm Long-Read Sequencing Kit* (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA). Produk PCR disekuensi dengan 8 primer: 20F, 300R, 520R, 810R, 1100R, 1400R, 1100F dan 1340F).

Hasil sekuen 16S rDNA dianalisis dan diedit dengan program GENETYX (Sabdon, 2001). Selanjutnya sekuen lengkap dari tiap isolat yang dipilih dibandingkan dengan sekuen DNA pada DNA database bank. Penelusuran dilakukan dengan sistem internet untuk memperoleh presentasi homologi dan untuk mengidentifikasi isolat. Selanjutnya studi filogenetik isolat dilakukan menggunakan program CLUSTAL W (ver. 1.60) program. Pohon filogenetik selanjutnya dikonstruksi dengan program PHYLIP.

Hasil dan Pembahasan

Purifikasi bakteri pada *P. trapezium* menemukan 19 isolat bakteri (Tabel. 1). Purifikasi isolat bakteri dilakukan berdasarkan perbedaan bentuk, tepi, permukaan, dan warna. Bentuk dari koloni yang ditemukan tidak teratur, bulat, berbenang serta titik-titik. Tepi dari koloni yang ditemukan berombak, berbenang, utuh serta keriting. Permukaan dari koloni yang ditemukan rata dan serupa kawah. Warna dari koloni yang ditemukan ialah putih, kuning, putih keruh serta putih transparan. Dari sejumlah 19 isolat bakteri pada gastropoda jenis *P. trapezium* memperlihatkan hampir sebagian besar (78,9%) memiliki warna putih keruh dan sisanya (10,5%) putih transparan, putih kekuningan (5,3%) dan putih (5,3%).

Berdasarkan uji kualitatif dari 19 isolat bakteri simbiosis terhadap bakteri MDR diperoleh 5 isolat yang mampu menghambat aktivitas bakteri uji, yakni isolat TPT 4.7, TPT 4.13, TPT 4.14, TPT 4.15, TPT 4.19. Uji kualitatif dilakukan dengan metode overlay yaitu pengujian menggunakan dua lapis agar. Diduga bahwa pertumbuhan bakteri MDR dihambat oleh senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat bakteri simbiosis. Seperti hasil yang memperlihatkan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar isolat bakteri simbiosis dari Gastropoda jenis *P. trapezium*. Sehingga memperlihatkan bukti bahwa isolat-isolat bakteri simbiosis memiliki potensi menghasilkan senyawa antibakteri dengan menghambat pertumbuhan bakteri uji.

Adanya metabolit sekunder antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri simbiosis Gastropoda jenis *P. trapezium* diduga sebagai bentuk adaptasi terhadap lingkungannya. Menurut Murniasih (2005) bahwa fungsi metabolit sekunder selain sebagai pertahanan diri, juga sebagai media interaksi dengan organisme lain, mencegah terjadinya infeksi dari mikroorganisme, dan sebagai media dalam proses reproduksi. Munifah *et al.* (2008) menyatakan bahwa metabolit sekunder berfungsi untuk melindungi diri dari predator dan bersifat toksik namun berkhasiat sebagai antikanker dan antibiotik.

Tabel 1. Data Morfologi Koloni bakteri pada *Pleuroploca trapezium*

Kode Isolat	Sifat Koloni			
	Bentuk	Tepi	Permukaan	Warna
TPT 4.1	Tak Teratur	Berombak	Rata	Putih Keruh
TPT 4.2	Bulat	Utuh	Rata	Putih Keruh
TPT 4.3	Serupa Akar	Bergerigi	Rata	Putih Transparan
TPT 4.4	Tak Teratur	Keriting	Rata	Putih Keruh
TPT 4.5	Bulat	Utuh	Rata	Putih Keruh
TPT 4.6	Titik	Keriting	Rata	Putih Keruh
TPT 4.7	Titik	Keriting	Rata	Putih Kekuningan
TPT 4.8	Bulat	Utuh	Rata	Putih Keruh
TPT 4.9	Tak Teratur	Berombak	Rata	Putih Keruh
TPT 4.10	Bulat	Utuh	Rata	Putih Keruh
TPT 4.11	Bulat	Utuh	Rata	Putih Keruh
TPT 4.12	Titik	Keriting	Rata	Putih Keruh
TPT 4.13	Tak Teratur	Keriting	Rata	Putih Keruh
TPT 4.14	Titik	Keriting	Rata	Putih Keruh
TPT 4.15	Bulat	Utuh	Melengkung	Putih Keruh
TPT 4.16	Titik	Keriting	Melengkung	Putih
TPT 4.17	Titik	Keriting	Melengkung	Putih Keruh
TPT 4.18	Bulat	Utuh	Rata	Putih Transparan
TPT 4.19	Kumpanan	Utuh	Rata	Putih Keruh

Uji kualitatif antibakteri MDR oleh setiap isolat bakteri simbion *Pleuroploca trapezium* terhadap bakteri uji MDR memperlihatkan bahwa isolat yang aktif terhadap masing-masing bakteri uji MDR adalah sebagai berikut: 4 isolat aktif terhadap bakteri MDR *Enterobacteria* strain 10 (TPT 4.13, TPT 4.14, TPT 4.15, TPT 4.19), 1 isolat aktif terhadap bakteri MDR *Klebsiella* sp. (TPT 4.7), 1 isolat aktif terhadap bakteri MDR CNS (TPT 4.7), tidak ada isolat aktif / pasif terhadap bakteri MDR *Pseudomonas* sp., tidak ada isolat aktif / pasif terhadap bakteri MDR *E. coli*, tidak ada isolat aktif / pasif terhadap bakteri MDR *Enterobacteria* strain 5. Dari 19 isolat bakteri simbion, terdapat 14 isolat bakteri yang tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji MDR (Tabel. 2).

Hasil uji kualitatif menunjukkan terdapat 14 isolat bakteri simbion yang tidak memperlihatkan aktivitas antibakterinya. Hal ini dapat disebabkan bakteri uji mampu menetralkan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat bakteri simbion Gastropoda jenis *P. trapezium*. Dwidjoseputro (1989) menyatakan apabila dua spesies dalam kondisi kompetisi dan berkembang pada tempat yang sama, maka spesies yang satu akan menghasilkan suatu senyawa yang dapat meracuni spesies yang lain, sehingga pertumbuhan spesies tersebut akan terganggu. Bakteri akan mengembangkan mekanisme pertahanan diri untuk menghadapi sesuatu yang mengancam kelangsungan hidupnya. Salah satu ancaman tersebut adalah perubahan kondisi lingkungan akibat kehadiran zat atau senyawa asing.

Hasil uji kuantitatif dapat dilihat bahwa isolat TPT 4.7 merupakan isolat bakteri yang aktif terhadap 2 jenis bakteri MDR, yaitu jenis bakteri MDR *Klebsiella* sp., dan CNS dengan zona hambatan yang berwarna bening. Isolat bakteri yang hanya dapat menghambat satu jenis bakteri MDR adalah isolat TPT 4.13, TPT 4.14, TPT 4.15, TPT 4.19 yang hanya aktif terhadap bakteri MDR jenis *Enterobacter* strain 10. Besar zona hambat untuk tiap bakteri uji berbeda-beda. Hal ini diduga karena konsentrasi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri simbion Gastropoda jenis *P. trapezium* berbeda-beda. Perbedaan jumlah bakteri

uji yang dapat dihambat dari setiap metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat bakteri simbion terhadap bakteri uji MDR ini dipengaruhi oleh beberapa faktor. Menurut Nursal dan Juwita (2006), perbedaan jumlah bakteri uji yang dapat dihambat bisa disebabkan perbedaan komponen dinding sel bakteri uji. Pada bakteri gram negatif yang memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks dan mengandung komponen lipid yang lebih banyak dibandingkan dengan bakteri gram positif, dinding selnya tidak mudah rusak.

Isolat bakteri yang menunjukkan adanya zona hambatan pada uji kualitatif selanjutnya diuji secara kuantitatif untuk pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk (Tabel 3). Pada uji kuantitatif dengan metode difusi agar, dalam satu cawan petri ditempatkan tiga buah paper disk. Kemampuan isolat bakteri dalam menghambat bakteri uji ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar paper disk.

Berdasarkan besar kecilnya zona hambat yang dihasilkan dan jumlah bakteri uji yang dapat dihambat maka isolat terpilih untuk identifikasi adalah isolat TPT 4.7 karena diameter zona hambat tertinggi dibentuk oleh isolat TPT 4.7 sebesar 10.02 mm. Sedangkan isolat TPT 4.14 memiliki zona hambat 8.68 mm, TPT 4.15 sebesar 9.23 mm dan terendah dibentuk oleh isolat TPT 4.13 sebesar 8.47 mm.

Berdasarkan hasil seleksi, isolat yang dipilih adalah isolat TPT 4.7 karena isolat tersebut memiliki kemampuan dalam menghambat 2 bakteri uji yaitu bakteri MDR jenis *Klebsiella* sp., dan CNS (*Coagulase Negative Staphylococcus*) dengan diameter zona hambat masing-masing diameter 10.02 mm dan 12.54 mm. Hal ini memperlihatkan bahwa isolat TPT 4.7 memiliki spektrum luas. Antibakteri spektrum luas ditunjukkan dengan penghambatan pertumbuhan terhadap beberapa bakteri uji. Hasil elektroforesis gel terlihat dengan munculnya warna terang pada band DNA. Amplifikasi PCR 16S rDNA diketahui berada pada band 1500 bp. Hasil Elektroforesis gel ditampilkan pada Gambar 1.

Tabel 2. Hasil Uji Kualitatif Antibakteri MDR Isolat Bakteri pada *Pleuroploca trapezium* terhadap Bakteri MDR

Kode Isolat	Aktivitas Antibakteri MDR					
	<i>Klebsiella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>E.Coli</i>	CNS	<i>Enterobacter</i> 5	<i>Enterobacter</i> 10
TPT 4.7	+	-	-	+	-	-
TPT 4.13	-	-	-	-	-	+
TPT 4.14	-	-	-	-	-	+
TPT 4.15	-	-	-	-	-	+
TPT 4.19	-	-	-	-	-	+

Keterangan : + = terbentuk zona hambat; - = tidak terbentuk zona hambat

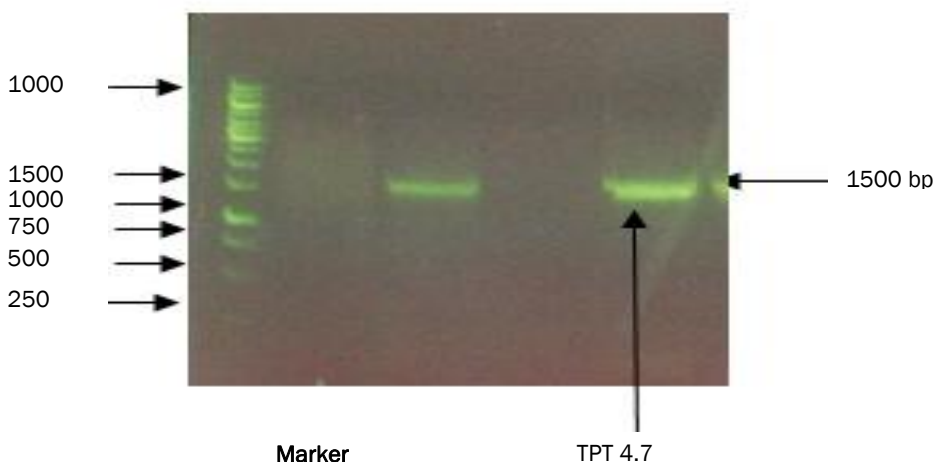
Konstruksi dendrogram menunjukkan bahwa isolat TPT 4.7 mempunyai kekerabatan yang dekat dengan *Paracoccus* sp. MBIC4019 yang ditampilkan pada Gambar 4. Hasil sekuensing yang berupa urutan nukleotida kemudian dianalisa homologinya dari data base GenBank NCBI untuk mencari kekerabatan yang terdekat dari isolat terpilih. Hasil penelusuran menunjukkan bahwa isolat TPT 4.7 memiliki homologi sebesar 95% dengan bakteri *Paracoccus* sp. MBIC4019. Sehingga dinyatakan bahwa isolat TPT 4.7 adalah genus *Paracoccus* sp. MBIC4019 dengan homologi sekuen 95%.

Genus *Paracoccus* terdiri dari gram negatif cocci atau tangkai pendek yang menunjukkan substansi metabolic yang tidak tetap. Menurut ilmu

genetik, genus ini termasuk subclass α -3 dari Proteobacteria. Bakteri *Paracoccus* sp. MBIC4019 termasuk dalam filum Proteobacteria, kelas Alphaproteobacteria, ordo Rhodobacterales, family Rhodobacteraceae (Hamada, 1999). Bakteri *Paracoccus* sp. MBIC4019 yang memiliki similiaritas dengan isolat TPT 4.7 adalah bakteri gram negatif ditemukan di pemandian air panas Himekayu, Jepang termasuk kelompok proteobacteria yang hidup di perairan. Protobakteri merupakan bakteri gram negatif yang membran luarnya tersusun dari lipopolisakarida, kelompok bakteri ini juga dapat mengkonversi energi cahaya matahari melalui proses fotosintesis. Berdasarkan database Genbank NCBI, hasil BLAST yang diperoleh melalui dapat dilihat pada Gambar 3.

Tabel 3. Hasil Uji Kuantitatif Antibakteri MDR Isolat Bakteri Pada *Pleuroploca trapezium* terhadap Bakteri MDR

No	Kode Isolat	Bakteri Uji	Diameter Zona Hambat (mm)	Keterangan
1	TPT 4.7	<i>Klebsiella</i> sp.	10.02	Bening
		CNS	12.54	Bening
2	TPT 4.13	<i>Entero 10</i>	8.47	Bening
3	TPT 4.14	<i>Entero 10</i>	8.68	Keruh
4	TPT 4.15	<i>Entero 10</i>	9.23	Bening
5	TPT 4.19	<i>Entero 10</i>	8.74	Keruh



Gambar 1. Hasil gel elektroforesis dengan metode PCR 16S rDNA menunjukkan isolat TPT 4.7

```

TPT 12-765R
AGGCGGTCGTATCAGAGCCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCCACCGAATATCT
ACGAATTCACCTCTACACTCGGTATTCCACTC.ACCTCTCTCGAACTCCAGACTGATAG
TTTTGGAGGCAGTTCGAGGTTGAGCCCCGGGATTTCACCCCCAACTTTCCAGTCCGC
CTACGTGCGCTTACGCCAGTAATTCCGAACAACGATAGCCCCCTATGAATTAACGC
GGCTGC

TPT 12-1141R
AATCTCCGACACGAGCTGACGACACCATGCACCACCTGTGCACCAGTCCAAAGAAAGC
CACATCTCTGCAGCCGTCCAGTGCATGTC.AAGCCTTGGTAAGGTTCTCGCGTTGCAT
CAAATTAATCAGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAATTCCTTTGAGTTTA
GCCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGGGC ACTTAATGC
    
```

Gambar 2. Urutan Pasang Basa Hasil Sekuensing DNA dengan Primer 765R dan 1141R

```

>|dbj|AB025190.1| Paracoccus sp. MBIC4019 gene for 16S rRNA, partial sequence
Length=1408

Score = 372 bits (201), Expect = 8e-101
Identities = 224/235 (95%), Gaps = 2/235 (0%)
Strand=Plus/Minus

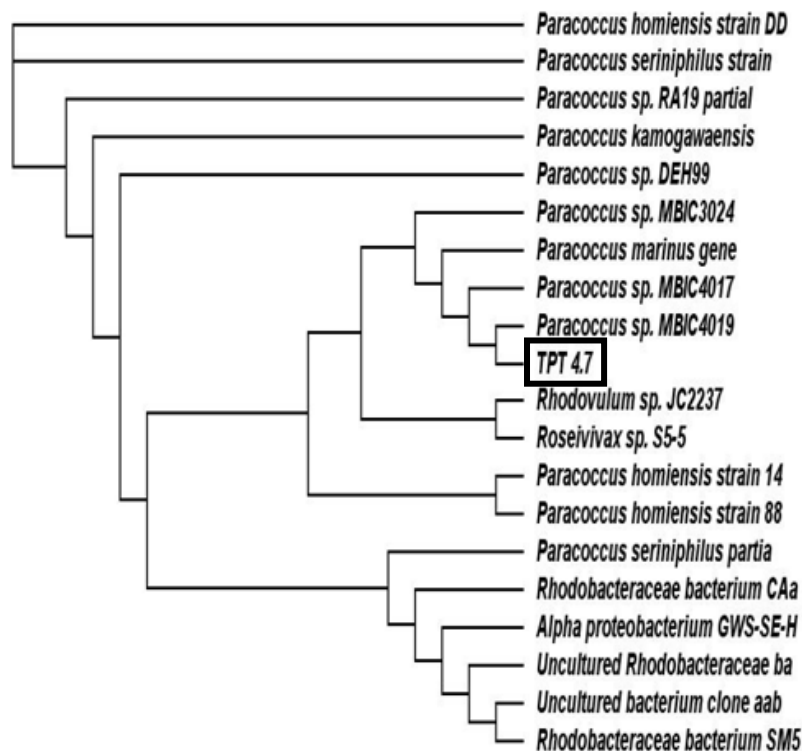
Query 6   GTC-GTATCAGAGCCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCACCCGAATATCTACGAAT 64
      ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 667  GTCAGTATC-GAGCCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCGAATATCTACGAAT 609

Query 65  TTCACCTCTACACTCGGTATTCACCTCACCTCTCTCGAACTCCAGACTGATAGTTTTGGA 124
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 608  TTCACCTCTACACTCGGAATTCACCTCACCTCTCTCGAACTCCAGACTGATAGTTTTGAA 549

Query 125 GGCAGTTCGAGGTTGAGCCCCGGGATTTACCCCCAACTTTCCAGTCCGCCTACGTGCG 184
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 548  GGCAGTTCGAGGTTGAGCCCCGGGATTTACCCCCAACTTTCCAGTCCGCCTACGTGCG 489

Query 185 CTTTACGCCAGTAATTCGAAACAACGATAGCCCCCTATGAATTAACGGCGGCTGC 239
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 488  CTTTACGCCAGTAATTCGAAACAACGCTAGCCCCCTCCGTATTACGGCGGCTGC 434
    
```

Gambar 3. Hasil Homologi Isolat TPT 4.7 dengan Genebank NCBI



Gambar 4. Dendrogram Isolat Bakteri TPT 4.7

Zhu *et al.* (2007) berhasil menskrining 42 isolat bakteri diantaranya *Paracoccus*. Bakteri tersebut diisolasi dari organisme, air dan sedimen laut serta berpotensi menghasilkan senyawa antibakteri. berdasarkan temuan Hamada (1999) dan Zhu *et al.* (2007), dapat disimpulkan bahwa bakteri *Paracoccus* sp. MBIC4019 yang ditemukan pada penelitian ini memperkuat data bahwa jenis bakteri ini potensial sebagai sumber senyawa metabolit dan antibakteri.

Kesimpulan

Hasil penelitian menemukan 5 isolat bakteri simbiosis yang mampu menghambat aktifitas bakteri

uji MDR. Masing-masing isolat memiliki kemampuan menghambat bakteri uji yang berbeda yaitu, isolat yang mampu menghambat dua bakteri uji yaitu, TPT 4.7 dan isolat yang mampu menghambat satu bakteri uji yaitu, TPT 4.13, TPT 4.14, , TPT 4.15 dan TPT 4.19. Identifikasi isolat terpilih TPT 4.7 menggunakan sekuen 16S rDNA menunjukkan isolat TPT 4.7 mempunyai persamaan tingkat genus dengan *Paracoccus* sp. MBIC4019.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih diucapkan kepada DIkti yang telah mendanai penelitian melalui Dana Hibah Kompetisi. Terma kasih juga diucapkan kepada Prof.

Dr. Ocky Karna Radjasa, MSc yang banyak membantu dan memberi kesempatan dalam penelitian serta publikasinya.

Daftar Pustaka

- Ahmad, I. & A.Z. Beg. 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J. Ethnopharmacology*. 74(2):113–123. doi: 10.1016/S0378-8741(00)00335-4
- Brooks, G.F., J.S. Butel & S.A. Morse. 2001. Mikrobiologi Kedokteran. Salemba Medika. Jakarta. 528 hlm.
- Cimino, G. & M. Gavagnin. 2006. Mollusc From Chemo-ecological Study to Biotechnology Application. Springer Berlin. Jerman
- Dwidjoseputro, D. 1989. Dasar-dasar Mikrobiologi. Djambatan, Jakarta, 188 hlm.
- Dwiprahasto, I. 2005. Kebijakan Untuk Meminimalkan Risiko Terjadinya Resistensi Bakteri di Unit Perawatan Intensif Rumah Sakit. *J. Manaj. Pelayanan Kes.* 8(4):177-180.
- Dijkshoorn, L., A. Nemeč & H. Seifert. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Rev. Microbiol.* 5:939-951. doi:10.1038/nrmicro1789
- Hamada, T. 1999. Identification and Classification of Alpha Proteobacteria. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=nucleotide&dopt=GenBank&RID=26P9EUS6012&log%24=nucltop&blast_rank=91&list_uids=4586609. (13 Agustus 2009).
- Harmawan, A., A. Ridho & D. Pringgencies. 2012. Uji Fitokimia dan Aktifitas Anti Bakteri Ekstrak Media Supernatan Bakteri Symbion Vibrio sp. Gastropoda *Oliva vidua* Terhadap Bakteri Multi Drug Resistant. *J Mar. Res.* 1(1):84-89.
- Irianto, K. 2006. Mikrobiologi. Menguak Dunia Mikroorganisme. Jilid I, CV. Yrama Widya, Bandung, 256 hlm.
- Kelecom, A. 2001. Secondary Metabolites from Marine Microorganism. *Ann. raz. Acad. Sci.* 74(1):151-170.
- Murniasih, T. 2005. Substansi Kimia Untuk Pertahanan Diri dari Hewan Laut Tak Bertulang Belakang. *Oseana*. 30(2):19-27.
- Munifah, I., T. Wiharta & M. Nursid. 2008. Sponge: Biota Laut Penghasil Senyawa Bioaktif Yang Potensial. Laboratorium Bioteknologi Kelautan. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonom, Kelautan dan Perikanan.
- Nursal, S.W. & W.S. Juwita. 2006. Bioaktivitas Ekstrak Jahe (*Zingiber officinale* Roxb.) dalam Menghambat Pertumbuhan Koloni Bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. *J. Bigen.* 2:64-66.
- Poutiers, J.M. 1998. FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Pacific. Volume 1. Seaweeds, corals, bivalves, and gastropods. FAO, Rome. p:363-648.
- Pringgencies, D. 2009. Bioprospeksi Bakteri Symbion dari Gastropoda *Conus miles* Terhadap Strain Bakteri IMDR (Multi Drug Resistant). *Ilmu Kelautan*. 14(1):42-49.
- Radjasa, O.K., D.S. Kencana, A. Sabdono, R.A. Hutagalung & E.S. Lestari. 2007. Antibacterial Activity of Marine Bacteria Associated with sponge *Aaptos* sp. against Multi Drugs Resistant (MDR) strains. *J. Mat. Sains.* 12(4):147-152.
- Sabdono, A. 2001. Identifikasi dan Analisis Genetik Bakteri Karang Pendegradasi Senyawa Herbisida 2,4-Diklorofenoksi Asetat di Laut Jawa. Disertasi UGM. 162. Hlm.
- Sukara, E. 2006. Pemanfaatan Biodiversity. *BioTrends*. 1:2.
- Suwandi, U. 1992. Resistensi Mikroba Terhadap Antibiotik. *J. Cermin Dunia Kedok.* 74:46-49.
- Utami, E.R. 2011. Antibiotika, Resistensi, dan Rasionalitas Terapi. *El-Hayah*. 1(4):191-198.
- Zhu, P., L. Zheng, J. Li, J.Z. Shao & X.J. Yan. 2007. Screening and characterization of marine bacteria with antibacterial and cytotoxic activities, and existence of PKS I and NRPS genes in bioactive strains. *Acta Microbiol. Sin.* 47(2):228-234.
- Wallace, M.L., M.P. Meredith, M.A. Brandon, T.J. Sherwin, A. Dale & A. Clarke. 2008. On the characteristics of internal tides and coastal upwelling behaviour in Marguerite Bay, west Antarctic Peninsula. *Deep-Sea Res. II* 55: 2023-2040. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.04.033>