

Penapisan Bakteri Symbion Gastropoda *Stramonita armigera* Penghasil Senyawa Antibakteri *Multi Drug Resistant* dari Perairan Ternate

Delianis Pringgenies*) dan Mijil Ciptaning Dananjoyo

Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro, Semarang 50275

Diterima 02-02-2010

Disetujui 03-12-2010

ABSTRACT

Antibiotic resistance is an ability of bacteria to hold the antibiotic effect. It was reported that there is a human-pathogen bacteria that resistance to one or more classes of antibiotic. It become a problem on medical world. To solve those problems, it is necessary to search the new antibiotic compounds that more effective and efficient to solve the problem of *Multi Drug Resistance* (MDR). The secondary metabolite-producing marine invertebrates and symbiont microorganisms, have prospect as an antibiotic. The symbiont microorganisms may produce the secondary metabolite similar to their host. The aims of the reseach were to determinate of gastropods symbiont bacteria that capable of producing Antibacterial MDR (*Multi Drugs Resistant*) Compound. Sample of Molusc were collected from Ternate (Molucas) islands. Isolation of symbiotic bacteria, screening for bacteria which producing secondary metabolites as anti-MDR bacteria, antibacterial test, isolation of clinical pathogenic bacteria (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. The result showed that 17 strains were isolated from gastropods *Stramonita armigera*. Antibacterial assays showed that TSA 8.7 isolate have ability to inhibit *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* dan *Enterobacter* sp. the molecular analyses showed that isolate TSA 8.7 closed by related to *Vibrio* sp. Strain JZDN1, with 98% of homology. Based on this experimental result, it could be concluded that gastropods-symbiont bacterium *Stramonita armigera* capable of producing antibacterial compound against strain Multi Drug Resistant (MDR). There is 11 isolates of gastropods-symbiont bacteria *Stramonita armigera* that have an antibacterial MDR activity.

Keywords: Antibacterial, Gastropods, Multi Drug Resistant, Symbion bacteria

PENDAHULUAN

Bahwa resistensi kuman terhadap antibiotik sudah merupakan problem diseluruh dunia baik di dalam rumah sakit atau di komunitas yang membutuhkan keseriusan dalam pengelolaan pasien dengan penyakit infeksi. Hal ini disebabkan karena penggunaan antibiotik/antimikroba yang tidak rasional/bijaksana yang dilakukan oleh prescribers (para dokter penulis resep) atau pasien sendiri. Bakteri yang telah mengalami resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik dikenal dengan bakteri *Multi Drug Resistant* (MDR). Bakteri *Multi Drug Resistant* (MDR) telah menjadi salah satu permasalahan dalam dunia kesehatan yang sangat serius, maka perlu dilakukan pencarian senyawa antibiotik baru yang lebih efektif dan efisien dalam mengatasinya.

Di sisi lain, metabolit dari mikroorganisme mengalami perkembangan pesat karena adanya dugaan bahwa sejumlah senyawa bioaktif yang diperoleh dari hewan invertebrata juga dihasilkan oleh mikroorganisme yang berasosiasi dengannya. Diperkirakan kurang dari 2% mikrobial baru berhasil diisolasi dari lingkungan laut sebagai kultur murni. Dilaporkan bahwa terdapat asosiasi mikroorganisme dengan organisme laut yang juga mensintesa metabolit sekunder seperti organisme inangnya (Watermann, 1999; Burgess *et al.*, 2003).

Gastropoda merupakan salah satu kelas dari filum moluska yang memiliki kemampuan menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai senyawa antibiotik. Seperti yang dinyatakan Westley dan Benkendorff 2008, bahwa Gastropoda jenis *Stramonita* memiliki senyawa bioaktif Bromindirubins yang memiliki aktivitas sebagai antikanker serta memiliki aktivitas antibakteri. Burgess *et al.*, (2003),

*Telp: +6281390800800

Email: pringgenies@yahoo.com

menyatakan bahwa mikroorganisme yang bersimbiosis dengan organisme laut memiliki kemampuan mensintesa metabolit sekunder seperti inangnya.

Salah satu alternatif untuk mendapatkan senyawa bioaktif dari Gastropoda yakni dengan mengisolasi bakteri simbiosis dari gastropoda tersebut maka tujuan penelitian adalah determinasi bakteri simbiosis Gastropoda *Stramonita armigera* yang memiliki aktivitas antibakteri *Multi Drug Resistant* (MDR) dengan menggunakan PCR 16S rDNA.

BAHAN DAN METODE

Sampling. Moluska dikoleksi dari perairan pulau Bastiong Kepulauan Ternate, Maluku dengan cara pengambilan langsung dengan menggunakan seperangkat alat scuba *diving* pada kedalaman sekitar 3 meter. Sampel kemudian dimasukkan dalam tas plastik polietilena (Whir-pak, Nasco, USA) dan ditempatkan dalam cool box. Selanjutnya dilakukan *Isolasi bakteri*, skrining bakteri penghasil senyawa anti-MDR, Uji antibakteri Gastropoda *Stramonita armigera*.

Isolasi Bakteri. Isolat bakteri hasil pengenceran dalam cawan petri dipurifikasi dengan metode goresan hingga diperoleh biakan murni (Brooks *et al.*, 2001). Selanjutnya, skrining bakteri penghasil antibakteri MDR dilakukan dengan menggunakan metode overlay untuk uji kualitatif (Isnansetyo & Kamei, 2003), dan metode difusi agar Kirby-Bauer untuk uji kuantitatif antibakteri MDR (Brooks *et al.*, 2001). Inkubasi dilakukan selama 2x24 jam kemudian diamati dan diukur zona hambatan yang terbentuk. Uji kualitatif dilakukan untuk mengetahui terbentuk atau tidaknya zona hambatan sedangkan pengukuran zona hambatan dilakukan pada uji kuantitatif.

Skrining bakteri penghasil senyawa anti-MDR. Tes uji hambatan pertumbuhan dilakukan antara isolat bakteri dari moluska terhadap bakteri MDR dengan menggunakan metode overlay. Setiap isolat dari moluska 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 diinokulasi isolat dari moluska sebelumnya. Petri diinkubasikan pada suhu ruang selama 48 jam. Aktivitas Anti-bakteri ditentukan oleh

adanya formation zona hambatan di sekeliling isolat Gastropoda.

Isolasi bakteri patogen klinik (MDR). Berbagai spesimen klinis (darah, feses, urine dll) didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Klinik, Rumah Sakit Kariadi/FK UNDIP Semarang, 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. Identifikasi bakteri dilakukan dengan berbagai uji yakni: morfologi koloni bakteri, uji katalase, uji coagulase, gram stain, haemolisis dalam Blood agar, pink colony dalam CHROM agar *S. aureus* dan CHROM agar MRSA media (gram positive bacteria), Mac Conkey agar plate (gram negative bacteria). Hasil bakteri MDR terdiri dari 6 strain bakteri MDR, yaitu: *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Escherichia coli*, *Coagulase-Negative Staphylococcus*, *Enterobacteria* strain 5 dan *Enterobacteria* strain 10.

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

Pelaksanaan Inokulasi. Isolat bakteri disuspensi dalam air garam steril, sehingga turbiditas tampak mencapai 0.5 standar McFarland standard. Suspensi bakteri langsung digunakan untuk uji difusi.

Uji sensitifitas antibakteri. Isolat bakteri dalam cawan petri dipurifikasi dengan metode goresan hingga diperoleh biakan murni (Brooks *et al.*, 2001). Selanjutnya, skrining bakteri penghasil antibakteri MDR dilakukan dengan menggunakan metode *overlay* untuk uji kualitatif dan metode difusi agar Kirby-Bauer untuk uji kuantitatif antibakteri MDR (Brooks *et al.*, 2001). Inkubasi dilakukan selama 2x24 jam kemudian diamati dan diukur zona hambatan yang terbentuk. Uji kualitatif dilakukan untuk mengetahui terbentuk atau tidaknya zona hambatan sedangkan pengukuran zona hambatan dilakukan pada uji kuantitatif.

Ekstraksi 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) (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.

Amplifikasi DNA. Amplifikasi DNA dilakukan dengan metode PCR berdasarkan metode yang dilakukan oleh Radjasa *et al.*, (2001). 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 selama 2 menit), dan ekstensi (72°C selama 2 menit), serta ekstensi terakhir pada 72°C selama 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 dengan PCR dipurifikasi dan dikonsentrasikan dengan menggunakan Microcon-100 microconcentrator (Amicon, Beverly, MA, USA) menurut instruksi dari pabrik. Reaksi sekuen gen 16S rDNA disiapkan dengan menggunakan dengan menggunakan *SequiTherm Long-Read Sequencing Kit* (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA).

Analisis sekuen 16S rDNA. Hasil sekuen 16S rDNA selanjutnya dianalisis dan diedit dengan menggunakan program GENETYX (Sabdono *et al.*, 2000). 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 dengan menggunakan

program CLUSTAL W (ver. 1,60) program. Pohon filogenetik selanjutnya akan dikonstruksi dengan menggunakan program PHYLIP.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Symbion Gastropoda. Jumlah isolat bakteri yang diperoleh dari gastropoda *Stramonita armigera* ialah berjumlah 17 isolat bakteri, dimana isolat tersebut memiliki sifat koloni yang dibedakan berdasarkan; bentuk, dimana bentuk dari koloni yang ditemukan ialah tidak teratur, bulat, berbenang serta titik-titik; tepi, dimana tepi dari koloni yang ditemukan ialah berombak, berbenang, utuh serta keriting; permukaan, permukaan dari koloni yang ditemukan ialah rata dan serupa kawah; dan warna, dimana warna dari koloni yang ditemukan ialah putih, kuning, putih keruh serta putih transparan.

Uji Kualitatif Antibakteri MDR (*Multi Drug Resistant*). Berdasarkan hasil uji kualitatif Antibakteri MDR memperlihatkan bahwa dari 17 isolat bakteri symbion gastropoda *Stramonita armigera* yang didapatkan, ternyata hanya 11 isolat bakteri symbion gastropoda yang memiliki potensi menghasilkan senyawa antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri MDR secara kualitatif.

Uji Kuantitatif Antibakteri MDR (*Multi Drug Resistant*). Hasil uji kuantitatif Antibakteri MDR dengan metode difusi agar berdasarkan prinsip Kirby-Bauer dan menggunakan kertas cakram yang berdiameter 8 mm memperlihatkan kemampuan daya hambat terhadap bakteri uji. Besarnya zona hambatan yang dibentuk maka terpilihlah satu isolat terbaik untuk uji lanjutan, yaitu isolat TSA 8,7 (Tabel. 1).

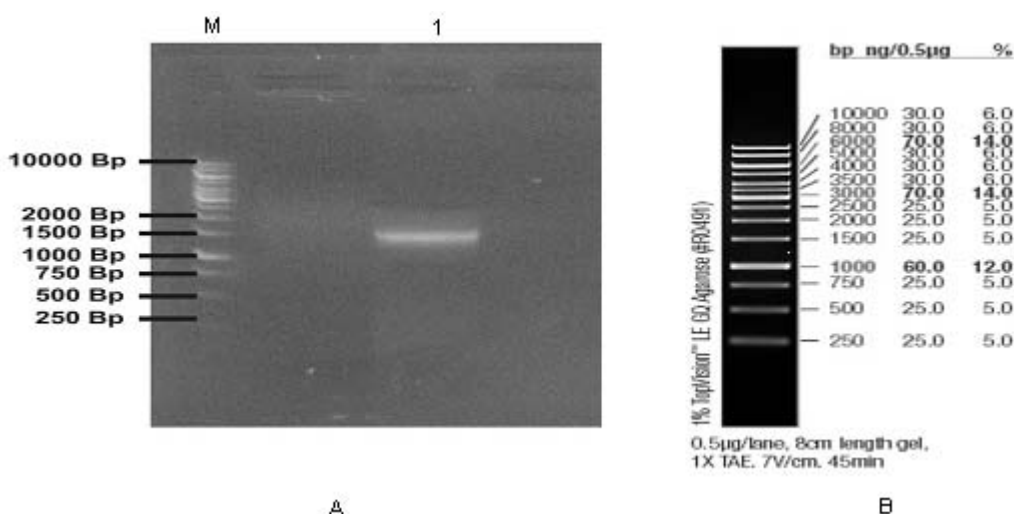
Identifikasi Bakteri. Hasil amplifikasi DNA dari isolat TSA 8,7 memperlihatkan hasil *single band* (pita tunggal) dengan ukuran sekitar 1500 bp (*base pair*) sesuai dengan pembandingan menggunakan *marker* (penanda) DNA seperti yang terlihat pada Gambar. 1.

Hasil sekuen gen 16S rDNA dari isolat bakteri gastropoda terpilih dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil penelusuran homologi sekuen 16S rDNA isolat TSA 8,7 dengan sekuen *DNA database Gene Bank* menggunakan sistem BLAST dapat dilihat pada Gambar 2. Sedangkan homologi isolat bakteri dengan bakteri dari *database Gene Bank* dapat dilihat pada Tabel 3.

Nilai kekerabatan hubungan antara isolat TSA 8,7 dengan sekuen pada data base yang sangat tinggi (>

Tabel 1. Hasil Uji Kuantitatif antibakteri MDR Bakteri *Stramonita armigera* terhadap Bakteri MDR

Kode Isolat	Diameter zona hambat (mm)					
	Klebsiella	Pseudomonas	E.Coli	CNS	Enterobacter 5	Enterobacter 10
TSA 8,1	-	9,23	-	-	-	8,66
TSA 8,2	-	9,63	-	-	9,95	8,56
TSA 8,3	-	8,63	-	-	9,22	-
TSA 8,4	-	8,90	-	-	9,53	8,62
TSA 8,5	-	10,29	-	-	9,59	8,78
TSA 8,6	-	-	-	-	-	8,88
TSA 8,7	-	11,59	9,01	-	9,71	-
TSA 8,8	-	-	-	12,91	-	-
TSA 8,9	-	-	-	-	-	8,77
TSA 8,10	-	-	-	-	-	-
TSA 8,11	-	-	-	-	-	-
TSA 8,12	-	-	-	-	-	-
TSA 8,13	-	-	-	-	-	-
TSA 8,14	-	13,53	8,64	-	-	-
TSA 8,15	-	10,95	8,82	-	-	-
TSA 8,16	-	-	-	-	-	-
TSA 8,17	-	-	-	-	-	-



Gambar 1. Hasil Amplifikasi Gen 16S rDNA TSA 8.7 (M: DNA Marker, 1: Isolat TSA 8.7) (A); DNA Marker (B)

Tabel 2. Sekuen dari Isolat Bakteri Simbion Gastropoda

Isolat	Sekuen
TSA 8,7	AGGGGTCGTATCTGGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTTCAGATCTCTACGCATTTACCCGCTACACC TGAAATTCTACCCCTCTACAGTACTCTAGTCTGCCAGTTTCAAATGCTATTCGAGGTTGAGCCCCGGGCTTTTAC ATCTGACTTAACAAACCACCTGCATGCGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTCGCACCTCCGTATTACCGCG GCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGTCTTCTGTGCGCTAACGTCAAATAAG

```
>gb|DQ658982.1| Vibrio sp. JZDN1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=978
Score = 508 bits (275), Expect = 6e-142
Identities = 280/282 (99%), Gaps = 2/282 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 5 GTC-GTATCTGGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTTCAGATCTCTACGCAT 63
Sbjct 397 GTCAGTATCT-GTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTTCAGATCTCTACGCAT 339
Query 64 TTCACCGCTACACCTGAAAATTCTACCCCTCTACAGTACTCTAGTCTGCCAGTTTCAA 123
Sbjct 338 TTCACCGCTACACCTGAAAATTCTACCCCTCTACAGTACTCTAGTCTGCCAGTTTCAA 279
Query 124 TGCTATTCCGAGGTTGAGCCCCGGGCTTTACATCTGACTTAACAAACCACCTGCATGCG 183
Sbjct 278 TGCTATTCCGAGGTTGAGCCCCGGGCTTTACATCTGACTTAACAAACCACCTGCATGCG 219
Query 184 CTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCTCCGTATTACCCGGGCTGCTGGCA 243
Sbjct 218 CTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCTCCGTATTACCCGGGCTGCTGGCA 159
Query 244 CGGAGTTAGCCGGTGTCTTCTTCTGTCGCTAACGTCAAATAAA 285
Sbjct 158 CGGAGTTAGCCGGTGTCTTCTTCTGTCGCTAACGTCAAATAAA 117
```

Gambar 2. Hasil Penelusuran Homologi Sekuen 16S rDNA Isolat TSA 8.7 dengan Sekuen *DNA Database Gene Bank* Menggunakan Sistem

Tabel 3. Homologi BLAST dari Isolat Bakteri Simbion Gastropoda

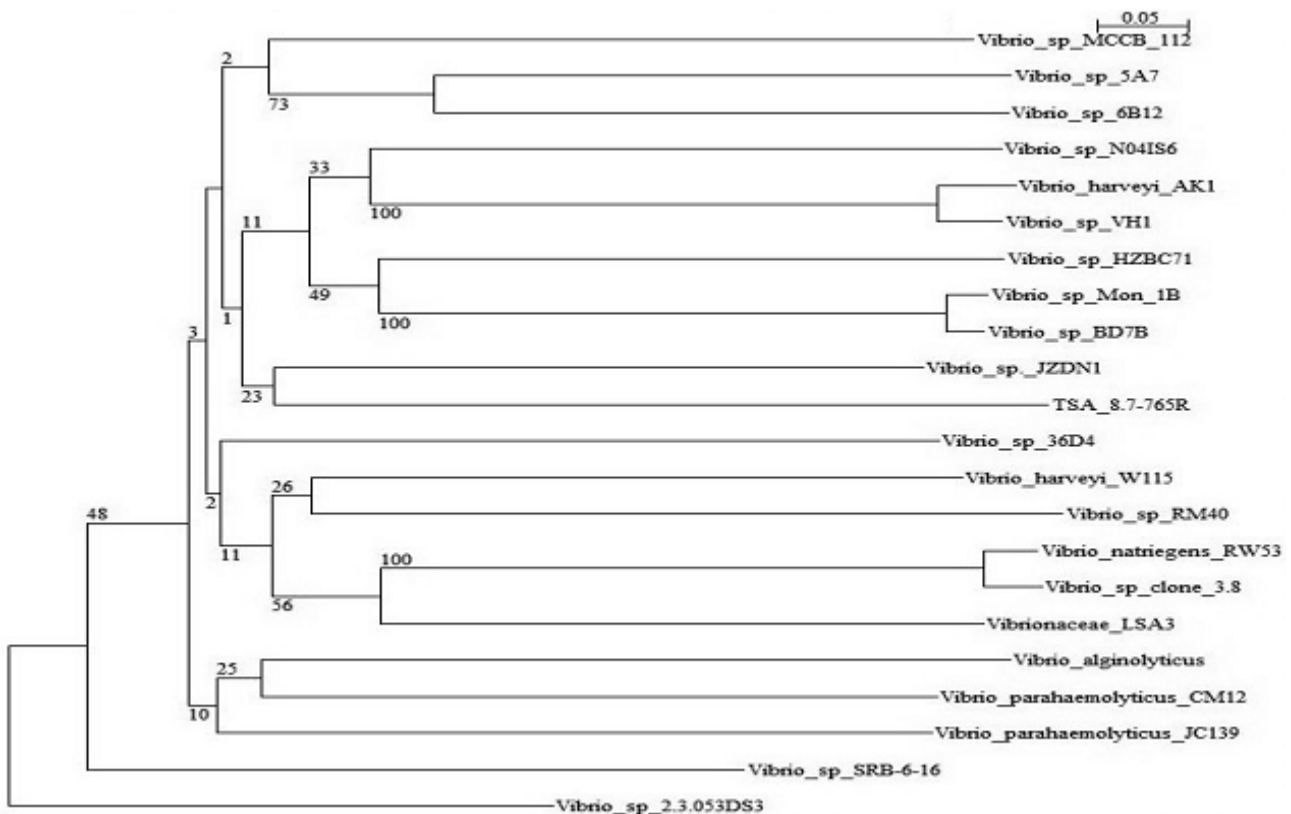
No.	Isolat	Kemiripan relatif	Homologi (%)	Nomor akses
1	TSA 8,7	<i>Vibrio sp. JZDN1</i>	98	DQ658982,1

95%) menunjukkan bahwa paling tidak identifikasi molekuler ini mendekati kebenaran pada tingkat genus.

Berdasarkan uji kualitatif (antibakteri MDR) diperoleh 11 isolat bakteri simbiosis yang mampu menghambat aktivitas bakteri uji, isolat-isolat tersebut ialah isolat TSA 8,1, TSA 8,2, TSA 8,3, TSA 8,4, TSA 8,5, TSA 8,6, TSA 8,7, TSA 8,8, TSA 8,9, TSA 8,14 dan TSA 8,15. Aktivitas antibakteri MDR diperlihatkan dengan terbentuknya zona hambat yang tampak sebagai daerah bening yang berada disekitar *paper disk*. Hasil ini membuktikan bahwa isolat-isolat bakteri tersebut memiliki potensi menghasilkan senyawa antibakteri dengan menghambat pertumbuhan bakteri uji. Penghambatan pertumbuhan bakteri uji tersebut dapat terjadi dikarenakan beberapa faktor, antara lain ialah adanya persaingan sebagai usaha dalam mendapatkan ruang dan nutrisi antara isolat bakteri simbiosis dengan bakteri uji serta adanya sistem pengeluaran metabolit sekunder yang dikeluarkan oleh isolat bakteri simbiosis. Dwidjoseputro (1988), menyatakan bahwa apabila dua spesies yang bersaing ditumbuhkan 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 ialah perubahan kondisi lingkungan akibat kehadiran zat/senyawa asing (Conseption *et al.*, 1994, dalam Sabdono *et al.*, 2006).

Kemampuan dari tiap-tiap isolat bakteri simbiosis dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji berbeda-beda (Tabel 1). Diketahui bahwa terdapat 4 isolat bakteri simbiosis yang mampu menghambat 3 bakteri uji yaitu, TSA 8,2, TSA 8,4, TSA 8,5 dan TSA 8,7; terdapat 4 isolat bakteri simbiosis yang mampu menghambat 2 bakteri uji yaitu, TSA 8,1, TSA 8,3, TSA 8,14 dan TSA 8,15; dan terdapat 3 isolat bakteri simbiosis yang mampu menghambat 1 bakteri uji yaitu, TSA 8,6, TSA 8,8 dan TSA 8,9. Kemampuan suatu isolat bakteri simbiosis dalam menghambat lebih dari satu jenis bakteri uji dapat terjadi karena isolat bakteri simbiosis tersebut mampu menghasilkan suatu senyawa bioaktif yang memiliki kemampuan dalam menghambat beberapa jenis bakteri. Sedangkan untuk isolat bakteri simbiosis yang hanya mampu menghambat satu jenis bakteri uji hal tersebut dapat terjadi karena senyawa bioaktif yang dihasilkan isolat bakteri tersebut hanya mampu menghambat satu jenis bakteri saja. Senyawa



Gambar 3. Pohon Filogenetik yang Menunjukkan Kekerabatan Terdekat Antara Isolat TSA 8.7 dengan Bakteri *Vibrio* sp. JZDN1 dengan Menggunakan Program *Tree View*

antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri memiliki sifat selektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri lain, hal tersebut memungkinkan suatu bakteri dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain, namun bakteri tersebut tidak dapat menghambat pertumbuhan dari jenis bakteri yang lainnya. Menurut Levinson (2004), senyawa antibakteri kisaran luas (*broad spectrum antibacterial*) ialah senyawa antibakteri yang mampu membunuh berbagai jenis mikroorganisme, sedangkan antibakteri kisaran sempit (*narrow spectrum antibacterial*) ialah senyawa antibakteri yang mampu mematikan hanya beberapa jenis mikroorganisme.

Berdasarkan hasil seleksi, isolat terpilih adalah isolat TSA 8,7 karena isolat tersebut memiliki kemampuan dalam menghambat 3 bakteri uji yaitu *Pseudomonas sp.*, *E. Coli*, dan *Enterobacteria sp* strain 5 dengan diameter zona hambat secara berurutan untuk ketiga bakteri uji ialah 11,59 mm; 9,01 mm; dan 9,71 mm.

Hasil amplifikasi 16SrDNA dari isolat TSA 8,7 menunjukkan bahwa isolat tersebut menghasilkan *single band* (pita tunggal) dengan ukuran sekitar 1500 bp sesuai dengan perbandingan menggunakan marker DNA (Gambar. 1). Besarnya ukuran ini sesuai dengan yang diharapkan dari gen-gen 16S rDNA bakteri. Sabdono (2001), dalam Sabdono *et al.*, (2006), menyatakan bahwa amplifikasi DNA dari isolat bakteri yang memiliki pita tunggal menunjukkan bahwa primer yang digunakan ialah primer spesifik untuk mengamplifikasi gen 16S rDNA pada bakteri. Amplifikasi 16S rDNA telah menjadi standar untuk mempelajari filogenetik dan keanekaragaman dari mikroorganisme laut.

Penelusuran pada *DNA database Gen Bank* menggunakan sistem BLAST melalui situs National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) memperlihatkan bahwa isolat TSA 8,7 memiliki homologi sebesar 98% dengan bakteri *Vibrio sp.* JZDN1. Hagström *et al.*, (2000), menyatakan bahwa isolat yang memiliki persamaan sekuen 16S rDNA lebih dari 97% dapat mewakili spesies yang sama. Sedangkan persamaan sekuen antara 93%-97% dapat mewakili identitas bakteri pada tingkat genus tetapi berbeda spesies. Berdasarkan pernyataan tersebut dapat dinyatakan bahwa isolat TSA 8,7 adalah spesies *Vibrio sp.* JZDN1 dengan homologi sekuen 98%.

Bakteri *Vibrio sp.* JZDN1 merupakan kelompok bakteri dari filum Proteobacteria, kelas Gammaproteobacteria, ordo Vibrionales, family Vibrionaceae, genus *Vibrio* dan Spesies *Vibrio sp.* JZDN1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Beberapa peneliti telah menemukan bahwa beberapa jenis bakteri *Vibrio sp.* yang ditemukan bersimbiosis dengan invertebrata laut mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder diantaranya ialah *Vibrio sp.* yang bersimbiosis dengan sponge *Dysidea sp.* mampu memproduksi senyawa brominated biphenyl ethers, *Vibrio spp.* pada sponge yang sama memproduksi senyawa Synthesize citotoksid dan Antibacterial tetrabromodiphenyl ethers (Elyakov *et al.*, 1991, dalam Lee *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2001). Kemudian Oclarit *et al.*, (1994), dalam Lee *et al.*, (2001), menambahkan bahwa *Vibrio sp.* memproduksi senyawa anti-Bacillus peptide andrimid seperti yang ditemukan pada ekstrak sponge *Hyatella sp.* Selain itu Umemoto *et al.*, (2008), melaporkan bahwa *Vibrio sp.* XY-214 mampu menghasilkan senyawa α -1,3-xylanase yang berguna untuk memproduksi D-xylose, yang merupakan sumber pembuatan xylitol dan bioethanol. *Vibrio sp.* strain NM 10 yang diisolasi dari *Leiognathus nuchalis* dari perairan jepang memiliki aktivitas dalam menghambat *Pasteurella piscicida* K-III penyebab penyakit ikan pasteurellosis pada ikan laut (Sugita *et al.*, 1997).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dari 17 isolat bakteri yang diisolasi dari Gastropoda *Stramonita armigera* didapatkan 11 isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri MDR dan isolat TSA 8.7 memiliki aktivitas antibakteri terbaik dibandingkan dengan isolat lainnya karena dapat menghambat 3 jenis bakteri MDR yakni bakteri *Pseudomonas*, *E. Coli* dan *Enterobacter* 5. Hasil identifikasi dari isolat bakteri terpilih menunjukkan bahwa isolat TSA 8.7 memiliki kesamaan terhadap jenis *Vibrio sp.* JZDN1 dengan homologi 98%.

UCAPAN TARIMA KASIH

Penelitian dibiayai oleh Program Insentif Riset Dasar-Dewan Riset Nasional-Kementerian Negara Riset, 2008. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Ocky K Radjasa dan Dr. Adus Sabdono MSc (Jurusan Ilmu Kelautan FPIK Universitas Diponegoro

Semarang), Sukrasno, Ph D (Sekolah Farmasi ITB Bandung) dan Endang Sri Lesatari, MD (Laboratorium Mikrobiologi Klinik, Fakultas Kedokteran UNDIP Semarang).

DAFTAR PUSTAKA

- Brooks, G.F., Butel, J.S. & Morse, S.A.** 2001. Mikrobiologi Kedokteran. Penerbit Salemba Medika, Jakarta, 528 hlm. (diterjemahkan oleh Eddy).
- Burgessa, J.G., Boyda, K.G., Amstronga, E., Jianga, Z., Yana, L., Berggrenb, M., Mayb, U., Pisacanec, T., Granmob, A.K. & Adamsd, D.R.** 2003. The Development of a Marine Natural Product-based Antifouling Paint. *Biofouling*, 2003. **19**: 197-205.
- Dwidjoseputro, D.** 1989. Dasar-dasar Mikrobiologi. Djambatan, Jakarta, 188 hlm.
- Hagström, A., Pinhassi, J. & Zweifel, U.L.** 2000. Biogeographical Diversity Among Marine Bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* **21**: 231-244.
- Kelecom, A.** 2001. Secondary Metabolites from Marine Microorganism. *Ann. raz. Acad. Sci.* **74(1)**: 151-170.
- Kumar Jha, R. & Xu Zi-rong.** 2004. Biomedical Compounds from Marine organisms. *Mar. Drugs.* **2**:123-146.
- Lee, Y.K., Lee, J.H & Lee, H.K.** 2001. Microbial Symbiosis in Marine Sponges. *J. Microbiol.* **39(4)**: 254-264.
- Leone, S., Silipo, A. Nazarenko, E.L., Lanzetta, R., Parrilli, M. & Molinaro, A.** 2007. Molecular Structure of Endotoxins from Gram-negative Marine Bacteria: An Update, *Mar. Drugs.* **5**: 85-112.
- Levinson, W.** 2004. *Medical Microbiology and Immunology*. Eight edition. McGraw-Hill, New York.
- Sabdon, A., Radjasa, O.K.T., & Bachtiar.** 2006. Eksplorasi Senyawa Bioaktif Antifoulant Bakteri yang Berasosiasi dengan Avertebrata Laut Sebagai Alternatif Penanganan Biofouling di Laut. [Lap. Pen. HB. XII/II]. Pusat Studi Pesisir Dan Laut Tropis, Universitas Diponegoro, Semarang, 46 hlm.
- Sugita, H., Matsuo, N., Hirose, Y., Iwato, M. & Deguchi, Y.** 1997. *Vibrio* sp. Strain NM 10, Isolated from the Intestine of a Japanese Coastal Fish, Has an Inhibitory Effect against *Pasteurella piscicida*. *App. Env. Microbiol.* **(63)**.
- Webster, N.S., Wilson, K.J., Blackall, L.L. & Hill, R.T.** 2001. Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Rhopaloides odorabile*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67(1)**: 434-444.
- Watermann, B.** 1999. Alternative antifoulant techniques present and future. *LimnoMar*: 1-6.