

Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri yang Berasosiasi dengan Kerang Pisau (*Solen* sp.)

Antibacterial Activities of the Isolates of Solen sp. Associated Bacteria

Oki W.D. Judianti*, Mahanani Tri Asri, Guntur Trimulyono
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Surabaya

ABSTRAK

Bakteri yang berasosiasi dengan kerang pisau (*Solen* sp.) berpotensi dalam menghasilkan senyawa antibakteri. Tujuan penelitian ini untuk mendeskripsikan aktivitas antibakteri bakteri yang berasosiasi dengan kerang pisau dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* FNCC 0091 dan *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, menentukan isolat bakteri asosiasi kerang pisau yang menunjukkan aktivitas antibakteri terbesar dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* FNCC 0091 dan *S. aureus* FNCC 0047, menguji aktivitas antibakteri metabolit sekunder bakteri asosiasi kerang pisau, menentukan metabolit sekunder yang menunjukkan aktivitas antibakteri terbaik. Metode yang digunakan untuk skrining kualitatif adalah *streak plate* dan metode yang digunakan untuk skrining kuantitatif adalah *well diffusion bilayer overlay*. Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri metabolit sekunder menggunakan metode *well diffusion*. Data hasil skrining dianalisis secara deskriptif dan data hasil uji aktivitas antibakteri metabolit sekunder dianalisis menggunakan ANAVA satu arah dan dilanjutkan menggunakan uji Duncan. Hasil skrining menunjukkan 7 dari 27 isolat bakteri asosiasi kerang pisau menunjukkan aktivitas antibakteri, yaitu S611, S522, S526, S621, S625, S618, dan S626. Tiga isolat terpilih yang menunjukkan aktivitas antibakteri terbaik adalah S526, S618, dan S621. Metabolit sekunder ketiga isolat tersebut menunjukkan aktivitas antibakteri. Metabolit ekstraseluler S621 menunjukkan aktivitas antibakteri terbaik terhadap *E. coli* FNCC 0091 dengan rata-rata diameter zona jernih $17,67 \pm 1,15$ mm. Metabolit ekstraseluler S526 menunjukkan aktivitas antibakteri terbaik terhadap *S. aureus* FNCC 0047 dengan rata-rata diameter zona jernih $39,67 \pm 1,15$ mm.

Kata kunci: Aktivitas antibakteri; bakteri asosiasi; kerang pisau (*Solen* sp.)

ABSTRACT

Solen sp. associated bacteria have potency to produce antibacterial compound. The purposes of this research were to describe the antibacterial activities of *Solen* sp. associated bacteria in inhibiting the growth of *Escherichia coli* FNCC 0091 and *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, to determine *Solen* sp. associated bacteria isolat which has the highest antibacterial activities to againts of *E. coli* FNCC 0091 and *S. aureus* FNCC 0047, to assay the antibacterial activities from secondary metabolites of *Solen* sp. associated bacteria, to determine secondary metabolites which has the best antibacterial activities. Assay of antibacterial activities was done by qualitative screening using of *streak plate* method and quantity screening using of *well diffusion bilayer overlay* method along with antibacterial activities of secondary metabolites using of *well diffusion* method. Result of screening showed that seven isolates from 27 isolates of *Solen* sp. associated bacteria exhibited antibacterial activities, namely of S611, S522, S526, S621, S625, S618 and S626. Three isolates which have the best antibacterial activities were S526, S618 and S621. Secondary metabolites of those three *Solen* sp. associated bacteria showed antibacterial activities. Extracelular metabolites of S621 showed the best antibacterial activity againts of *E. coli* FNCC 0091, and the average diameter of clear zone was 17.67 ± 1.15 mm. Extracelular metabolites of S526 showed the best antibacterial activity againts of *S. aureus* FNCC 0047, and the average diameter of clear zone was 39.67 ± 1.15 mm.

Key words: antibacterial activities, associated bacteria, razor clams (*Solen* sp.)

* Alamat Korespondensi:

surel: .okiwahyue@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Laut merupakan salah satu ekosistem dipermukaan bumi yang memiliki sumber kekayaan biologi dan bahan kimia hayati yang sangat besar. Bahan kimia hayati yang terkandung pada ekosistem laut merupakan senyawa-senyawa kimia yang dihasilkan dari akumulasi dan metabolit sekelompok hewan invertebrata laut seperti tunikata, spons, karang lunak, mollusca, coelenterata dan bryozoa (Jha dan Xu, 2004).

Senyawa-senyawa kimia yang dihasilkan oleh sekelompok invertebrata laut merupakan produk dari asosiasi antara hewan invertebrata laut dengan mikroorganisme pada tubuhnya yang berupa metabolit sekunder. Metabolit sekunder dihasilkan oleh mikroorganisme berfungsi untuk mempertahankan diri terhadap patogen. Metabolit sekunder tersebut tereksresi sebagai bentuk respons mikroorganisme untuk bertahan terhadap kondisi lingkungan (Nofiani *et al.*, 2009). Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroorganisme memiliki karakter seperti metabolit sekunder yang dihasilkan oleh inangnya (Pringgenies dan Dananjoyo, 2010). Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroorganisme laut yang berasosiasi dengan invertebrata mampu menunjukkan adanya aktivitas biologis dan farmakologi dalam bentuk senyawa bioaktif (Khanna, 2010).

Bivalvia seperti *Solen sp.* merupakan invertebrata laut yang bersifat *filter feeder* sehingga memungkinkan mikroorganisme masuk ke dalam tubuh bivalvia dan berasosiasi dengan tubuhnya. Keberadaan bakteri yang berasosiasi dengan bivalvia telah memungkinkan penggunaan organisme tersebut sebagai sumber utama senyawa antibakteri. Senyawa bioaktif yang dihasilkan dari bakteri yang berasosiasi pada bivalvia telah dimanfaatkan sebagai antitumor, antibakteri, antiviral, antifungal, antiinflamasi dan enzim penghambat (Ruyitno, 2004). Beberapa bakteri yang berasosiasi dengan bivalvia dan memiliki aktivitas antibakteri adalah *Vibrio sp.*, *Pseudoalteromonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas media*, *Phaeobacter gallaeciensis* (Romalde dan Barja, 2010). Bakteri dari genus *Pseudoalteromonas sp.*, *Aeromonas sp.* dan *Bacillus sp.* yang berasosiasi dengan *Anadara broughtoni* menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Xanthomonas sp.*, dan *Enterococcus faecium* (Romanenko *et al.*, 2008).

Kerang pisau (*Solen sp.*) hidup pada habitat substrat pasir berlumpur yang terdapat banyak patogen sehingga kerang pisau dan bakteri yang berasosiasi dengan tubuhnya mengembangkan pertahanan diri dengan cara mensintesis senyawa bioaktif. Melihat potensi tersebut perlu dilakukan isolasi dan skrining bakteri yang berasosiasi pada tubuh kerang pisau (*Solen sp.*) untuk mendapatkan isolat bakteri yang

berpotensi menghasilkan senyawa antibakteri. Isolat tersebut dapat dikembangkan untuk menghasilkan senyawa antibakteri baru untuk bakteri yang MTD (*Multi Drugs Resistent*) ataupun bakteri non MTD (*Multi Drugs Resistent*) sehingga akan memberikan sumbangan kemajuan dalam bidang farmakologi dan ekonomi. Tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas antibakteri bakteri yang berasosiasi dengan kerang pisau (*Solen sp.*), Menentukan isolat terbaik yang menunjukkan aktivitas antibakteri terbesar, menguji aktivitas antibakteri dari metabolit sekunder bakteri asosiasi kerang pisau dalam menghambat bakteri uji, dan menentukan metabolit sekunder bakteri asosiasi yang terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan Januari-April 2014. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi UNESA. Bahan-bahan yang digunakan yaitu kerang pisau (*Solen sp.*), media SWC (*Sea Water Completed*), media *Nutrient Broth* dan *Nutrient Agar*, kloramfenikol sebagai kontrol positif dan bakteri uji *Escherichia coli* FNCC 0091 dan *Staphylococcus aureus* FNCC 0047. Prosedur kerja meliputi pengambilan sampel, isolasi bakteri asosiasi kerang pisau, skrining aktivitas antibakteri dari isolat bakteri asosiasi kerang pisau terhadap bakteri uji, dan uji aktivitas antibakteri dari metabolit sekunder bakteri asosiasi kerang pisau yang terpilih.

Pengambilan Sampel

Sampel kerang pisau diambil langsung dari pantai Talang siring Pamekasan, Madura pada waktu pagi dan kondisi pantai surut maksimal. Sampel kerang pisau dimasukkan ke dalam plastik steril dan disimpan dalam *cool box*.

Isolasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Kerang Pisau

Isolasi bakteri yang berasosiasi dengan kerang pisau dilakukan dengan cara sampel kerang pisau yang diperoleh disemprot permukaan cangkang dan tubuh lunaknya menggunakan air laut steril sebanyak 3 kali dan sifon pada tubuh lunaknya dihilangkan. Sebanyak 10 g sampel tubuh lunak kerang pisau dihaluskan dan diencerkan ke dalam 90 ml NaCl 0,85%. Pengenceran dilakukan sampai pada pengenceran 10^{-6} . Pengenceran dari 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} di-*pour plate* secara duplo menggunakan media SWC (*Sea Water Completed*) dengan komposisi 5 g/l bacto pepton, 1 g/l *yeast extract*, 3 ml/l gliserol dilarutkan ke dalam 750 ml air laut steril dan ditambahkan 1,5% agar. Hasil *pour plate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh dipurifikasi dengan metode *streak plate*. Isolasi hasil

purifikasi dikultivasi dan disimpan dalam media SWC agar miring.

Skrining Kualitatif Isolat Bakteri Asosiasi Kerang Pisau

Skrining kualitatif seperti yang dilakukan oleh Abubakar (2009), dengan cara menggoreskan isolat bakteri secara *streak plate* pada permukaan media SWC agar. Media SWC agar di-*pour plate* pada cawan Petri steril yang telah berisi 1 ml (10^6 cfu/ml) bakteri uji umur 24 jam. Setelah memadat, isolat bakteri di goreskan (*streak plate*) di atas permukaan media SWC agar yg telah berisi bakteri uji dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Isolat bakteri yang menunjukkan aktivitas antibakteri akan membentuk zona jernih disekeliling koloninya.

Skrining Kuantitatif Isolat Bakteri Asosiasi Kerang Pisau

Skrining secara kuantitatif seperti yang dilakukan oleh Sarkono *et al.* (2010), menggunakan metode *well diffusion bilayer overlay* dengan cara melapisi 2 lapisan media agar, lapisan pertama (bawah) media NA solid dan lapisan kedua (atas) media SWC semisolid. Isolat bakteri asosiasi yang menunjukkan aktivitas antibakteri dari skrining kualitatif ditumbuhkan pada media SWC cair dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Media NA di-*pour plate* pada cawan Petri steril yang telah berisi 1 ml (10^6 cfu/ml) bakteri uji umur 24 jam dan ditunggu sampai memadat (lapisan pertama). Media SWC semisolid di-*pour plate* di atas lapisan pertama dan ditunggu sampai memadat. Sumuran dengan diameter 6 mm dibuat setelah media memadat. Kultur isolat bakteri asosiasi yang telah ditumbuhkan pada SWC cair berumur 24 jam disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Pelet dicuci menggunakan akuades steril. Pelet diambil sebanyak 50 μ l dimasukkan ke dalam sumuran untuk diuji aktivitas antibakterinya terhadap *E. coli* FNCC 0091 dan *S. aureus* FNCC 0047, selanjutnya media uji di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Aktivitas antibakteri dari uji berupa zona jernih yang terbentuk di sekeliling sumuran. Besarnya nilai hambatan dari aktivitas antibakteri di ukur dengan cara diameter zona jernih dikurangi dengan diameter sumuran dan di konversikan dalam satuan millimeter.

Uji Aktivitas Antibakteri Metabolit Sekunder Isolat Terpilih Bakteri Asosiasi Kerang Pisau

Metabolit sekunder yang diuji meliputi metabolit ekstraseluler (supernatan) dan metabolit intraseluler (ekstrak metabolit intraseluler sel bakteri). Metabolit sekunder yang digunakan merupakan metabolit sekunder hasil dari inkubasi kultur isolat bakteri terpilih selama 5 hari pada medium SWC (Nofiani, 2009). Supernatan diperoleh dengan cara mensentrifugasi kultur cair isolat bakteri dengan

kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri uji menggunakan metode *well diffusion*.

Metabolit intraseluler dalam bentuk ekstrak kasar metabolit intraseluler sel bakteri. Isolat bakteri ditumbuhkan pada media SWC cair selama 5 hari. Kultur cair disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dan pelet dipisahkan. Pelet dimaserasi menggunakan pelarut metanol 96% dengan perbandingan 1:2 selama 24 jam. Hasil maserasi disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan diambil dan dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kasar metabolit intraseluler. Ekstrak kasar metabolit intraseluler diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri uji menggunakan metode *well diffusion*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi memperoleh sebanyak 27 isolat bakteri yang berasosiasi dengan kerang pisau (*Solen sp.*). Jumlah bakteri yang berasosiasi dengan kerang pisau (*Solen sp.*) sebanyak $1,3 \times 10^7$ cfu/g. Hasil skrining secara kualitatif memperoleh 7 dari 27 isolat bakteri yang berasosiasi dengan kerang pisau menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* FNCC 0091 dan *S. aureus* FNCC 0047. Tujuh isolat bakteri tersebut membentuk zona jernih disekeliling koloni saat diuji antagonisme terhadap bakteri uji.

Tujuh isolat yang menunjukkan aktivitas antibakteri yaitu isolat S522, S526, S611, S618, S621, S625, dan S626. Isolat S526, S611, S618, dan S621 menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* FNCC 0091 dan *S. aureus* FNCC 0047. Isolat S522 dan S625 hanya mampu menghambat *S. aureus* FNCC 0047 dan isolat S626 hanya mampu menghambat *E. coli* FNCC 0091.

Tujuh isolat dilakukan skrining lanjutan menggunakan metode *well diffusion bilayer overlay* untuk mengetahui besarnya nilai hambatan aktivitas antibakteri serta menentukan 3 isolat yang menunjukkan aktivitas antibakteri terbaik. Hasil skrining kuantitatif didapatkan 3 isolat yang menunjukkan aktivitas antibakteri terbaik yaitu isolat S526, S618 dan S621.

Isolat S621, S618, dan S526 merupakan tiga isolat yang menunjukkan aktivitas antibakteri terbaik dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* FNCC 0091 dan *S. aureus* FNCC 0047 (Tabel 1). Aktivitas antibakteri yang ditunjukkan dari ketiga isolat terbaik tersebut berupa zona jernih yang lebih besar dibandingkan dengan isolat-isolat yang lainnya.

Ketiga isolat terbaik dikarakterisasi secara sederhana meliputi pewarnaan Gram dan uji katalase. Karakter dari ketiga isolat tersebut ditabulasikan pada Tabel 2.

Tiga isolat terbaik yang diperoleh dari hasil skrining dilanjutkan dengan menguji aktivitas antibakteri dari metabolit sekunder yang dihasilkan. Hasil uji ANAVA dengan nilai signifikansi $\alpha = 0,05$ untuk *E. coli* menunjukkan bahwa F hitung (592,00) > F tabel (4,07) atau $p < \alpha$ ($0,00 < 0,05$) dan hasil uji ANAVA dengan nilai signifikansi $\alpha = 0,05$ untuk *S. aureus* menunjukkan bahwa F hitung (242,75) > F tabel (4,07) atau $p < \alpha$ ($0,00 < 0,05$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan dari setiap perlakuan sehingga dilanjutkan dengan uji Duncan untuk mengetahui perlakuan terbaik.

Semua perlakuan terhadap *E. coli* menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan kontrol negatif sehingga semua perlakuan menunjukkan aktivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* (Tabel 3). Metabolit ekstraseluler (supernatan) S621 menunjukkan aktivitas antibakteri terbesar dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* dengan nilai

hambat sebesar $17,67 \pm 1,15$ mm. Metabolit intraseluler (ekstrak metabolit intraseluler) S526 menunjukkan aktivitas antibakteri terendah dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* dengan nilai hambat sebesar $9,33 \pm 0,58$ mm. (Tabel 3).

Beberapa perlakuan menunjukkan aktivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* (Tabel 3). Metabolit ekstraseluler S618, metabolit intraseluler S618 dan kontrol negatif menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata. Metabolit intraseluler dari S618 tidak mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Metabolit ekstraseluler dari S618 mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* tetapi pengaruhnya sangat kecil karena hasil yang ditunjukkan tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif. Metabolit ekstraseluler (supernatan) S526 menunjukkan aktivitas antibakteri terbesar dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan nilai hambat sebesar $39,67 \pm 1,15$

Tabel 1. Skrining aktivitas antibakteri dari isolat-isolat bakteri yang berasosiasi dengan kerang pisau (*Solen* sp.) yang menunjukkan aktivitas antibakteri

No	Kode Isolat	Diameter Zona Jernih (mm)	
		<i>Escherichia coli</i> (FNCC 0091)	<i>Staphylococcus aureus</i> (FNCC 0047)
1	S522	$6 \pm 1,41$	$2 \pm 1,41$
2	S526	$10 \pm 2,82$	$13 \pm 2,82$
3	S611	$6 \pm 0,00$	$7 \pm 2,82$
4	S618	$11 \pm 1,41$	$18 \pm 1,41$
5	S621	$20 \pm 2,82$	$16 \pm 1,41$
6	S625	0	$6 \pm 2,82$
7	S626	$1 \pm 0,00$	0

Tabel 2. Karakter morfologi dan biokimiawi sel isolat bakteri terpilih

Kode Isolat	Gram	Bentuk Sel	Rangkaian Sel	Katalase
S526	Negatif	<i>Coccus</i>	<i>Monococcus</i>	Positif
S618	Negatif	<i>Coccus</i>	<i>Streptococcus</i>	Positif
S621	Negatif	<i>Coccus</i>	<i>Monococcus</i>	Positif

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antibakteri metabolit sekunder isolat bakteri yang berasosiasi dengan kerang pisau (*Solen* sp.).

No	Perlakuan	Rata-rata Diameter Zona jernih (mm)	
		<i>E. coli</i> FNCC 0091	<i>S. aureus</i> FNCC 0047
1.	Kontrol Positif (Kloramfenikol 500 mg/500 ml)	$36,33 \pm 0,58^f$	$31,67 \pm 4,73^c$
2.	Kontrol Negatif (<i>Nutrient Broth</i>)	0 ^a	0 ^a
3.	Metabolit Ekstraseluler (Supernatan S526)	$14,67 \pm 0,58^d$	$39,67 \pm 1,15^e$
4.	Metabolit Ekstraseluler (Supernatan S618)	$11,33 \pm 0,58^c$	$1,33 \pm 0,58^a$
5.	Metabolit Ekstraseluler (Supernatan S621)	$17,67 \pm 1,15^e$	$9,33 \pm 0,58^b$
6.	Metabolit Intraseluler (Ekstrak Metabolit Intraseluler S526)	$9,33 \pm 0,58^b$	$35,67 \pm 1,53^d$
7.	Metabolit Intraseluler (Ekstrak Metabolit Intraseluler S618)	$10,67 \pm 0,58^c$	0 ^a
8.	Metabolit Intraseluler (Ekstrak Metabolit Intraseluler S621)	$14,67 \pm 1,15^d$	$11,67 \pm 1,15^b$

Keterangan: Notasi (a, b, c, d, e dan f) pada rata-rata diameter zona jernih didapatkan dari uji Duncan dengan taraf kepercayaan 0,05%. Notasi yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata. Notasi yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata.

mm. Metabolit ekstraseluler (supernatan) S618 menunjukkan aktivitas antibakteri terendah dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* dengan nilai hambat sebesar $1,33 \pm 0,58$ mm (Tabel 3). Hasil uji menunjukkan bahwa metabolit sekunder isolat bakteri yang berasosiasi dengan kerang pisau (*Solen* sp.) terpilih lebih memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* daripada *S. aureus*. Hasil tersebut ditunjukkan dengan kemampuan dari semua perlakuan mampu menghambat *E. coli*.

Sebanyak 27 isolat bakteri yang berasosiasi dengan kerang pisau (*Solen* sp.) telah berhasil diisolasi. Hasil skinning secara kualitatif 7 dari 27 isolat bakteri yang berasosiasi dengan kerang pisau (*Solen* sp.) menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji *E. coli* FNCC 0091 dan *S. aureus* FNCC 0047. Aktivitas antibakteri tersebut dapat dideteksi dengan adanya zona jernih yang terbentuk disekeliling koloni isolat bakteri yang berasosiasi dengan kerang pisau (*Solen* sp.). Penelitian sebelumnya mengenai uji aktivitas antibakteri bakteri yang berasosiasi dengan invertebrata laut yang dilakukan oleh Romanenko *et al.* (2008), menunjukkan hasil yang sama 8 dari 149 isolat bakteri yang berasosiasi dengan kerang darah (*Anadara broughtoni*) mampu menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*. Hasil penelitian Pringgenies (2009), sebanyak 16 isolat bakteri yang bersimbiosis dengan gastropoda jenis *Conus miles* mampu menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri MTD (*Multi Drug Resistent*) *E. coli*. Hasil penelitian Anand (2006), 16 dari 75 isolat bakteri yang berasosiasi dengan spons jenis *Echinodictyum* sp., *Spongia* sp., *Sigmatocia fibulatus* dan *Mycale mannarensis* menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*. Menurut Ruyitno (2004), bakteri yang berasosiasi dengan spons, moluska, alga dan tunikata memiliki aktivitas biologis sebagai agen senyawa antibakteri.

Isolat-isolat yang menunjukkan aktivitas antibakteri pada skrining secara kualitatif diuji aktivitas antibakterinya menggunakan metode sumuran (*well diffusion*) dengan *bilayer overlay* untuk menentukan isolat yang menunjukkan aktivitas antibakteri terbaik. Hasil pengujian memperoleh 3 isolat yang menunjukkan aktivitas antibakteri terbaik yaitu isolat S526, S618, dan S621. Ketiga isolat tersebut ditentukan berdasarkan besarnya diameter zona jernih yang dihasilkan dan kemampuannya dalam menghambat kedua jenis bakteri uji. Isolat S526, S618, dan S621 menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dengan diameter zona jernih yang dihasilkan secara berturut-turut $10 \pm 2,82$ mm; $11 \pm 1,41$ mm; $20 \pm 2,82$ mm. Isolat S526, S618, dan S621 mampu menghambat *S. aureus* dengan besar diameter zona jernih yang dihasilkan secara berturut-turut $13 \pm 2,82$ mm; $18 \pm 1,41$ mm; $16 \pm 1,41$ mm. Zona jernih yang dihasilkan dari ketiga isolat tersebut berdasarkan Rao *et al.* (2013), tergolong

kuat karena berada pada rentang skala 10–20 mm (Tabel 1). Hasil tersebut menunjukkan bahwa secara rata-rata ketiga isolat tersebut lebih menghambat pertumbuhan *S. aureus* daripada *E. coli*.

Penelitian Zheng *et al.*, (2005), menunjukkan hasil yang sama yaitu bakteri laut dari genus *Alteromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. dan *Flavobacterium* yang telah diisolasi dari sedimen laut, air laut, invertebrata dan makroalga menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* daripada bakteri *E. coli*. Hasil yang sama juga ditunjukkan pada penelitian Abubakar (2009), bakteri *Pseudomonas* sp. dan *Bacillus* sp. yang berasosiasi dengan spons *Japsis* sp. lebih menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* daripada bakteri *E. coli*. Perbedaan tingkat sensitivitas tersebut karena adanya perbedaan struktur komponen dan ketebalan dinding sel yang dimiliki oleh bakteri yang dapat mempengaruhi hambatan dan kemampuan senyawa antibakteri dalam merusak lapisan dinding sel.

Staphylococcus aureus merupakan kelompok bakteri Gram positif. Dinding sel bakteri Gram positif mengandung lapisan peptidoglikan (murein) yang lebih banyak dan asam teikoat. *Escherichia coli* merupakan kelompok bakteri Gram negatif. Dinding sel Gram negatif mengandung satu atau beberapa lapis peptidoglikan dan membran luar. Struktur dinding sel bakteri Gram negatif terdapat daerah periplasma yang terletak diantara membran luar dan membran plasma serta berisi enzim degradasi konsentrasi tinggi dan protein-protein transport sehingga dinding sel bakteri Gram negatif relatif lebih tahan terhadap kerusakan mekanis (Pratiwi, 2008). Struktur tersebut yang membuat senyawa antibakteri tidak mudah merusak lapisan dinding sel bakteri Gram negatif dibandingkan dengan Gram positif. Bakteri-bakteri yang berasosiasi dengan invertebrata laut mampu menunjukkan aktivitas antibakteri. Aktivitas antibakteri yang ditunjukkan dalam bentuk sifat antagonisme terhadap pertumbuhan bakteri patogen dengan cara mensintesis senyawa bioaktif yang bersifat antibakteri. Biosintesis senyawa-senyawa antibakteri tersebut memiliki peranan penting pada saat pelekatan, kolonisasi, kompetisi dalam menempati ruang dan nutrisi dengan mikroorganisme yang lain (Romanenko *et al.*, 2008).

Zona jernih yang terbentuk disekeliling isolat-isolat bakteri S526, S618 dan S621 akibat dari aktivitas senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh isolat tersebut. Senyawa antibakteri tersebut disintesis sebagai respons antagonisme antara isolat bakteri asosiasi dengan bakteri uji (*E. coli* FNCC 0091 dan *S. aureus* FNCC 0047). Keberadaan bakteri patogen bagi isolat-isolat bakteri yang berasosiasi dengan kerang pisau (*Solen* sp.) merupakan kompetitor dalam memperebutkan ruang dan nutrisi. Adanya kompetisi tersebut mengakibatkan isolat bakteri

mensintesis senyawa antibakteri untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang dianggap sebagai kompetitor. Senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri-bakteri yang berasosiasi dengan invertebrata laut yang menunjukkan aktivitas antibakteri merupakan produk dari metabolit sekunder. Pembentukan metabolit sekunder dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya ketersediaan nutrisi, penurunan kecepatan pertumbuhan, dan inaktivasi enzim. Pembentukan senyawa metabolit sekunder dikode oleh sejumlah gen yang terdapat pada DNA kromosom atau DNA plasmid (Nofiani *et al.*, 2009). Metabolit sekunder biasanya disintesis pada saat mikroorganisme dalam kondisi tercekam atau stres (Nofiani, 2008). Keberadaan bakteri patogen sebagai kompetitor merupakan salah satu bentuk kondisi stres atau tercekam, sehingga isolat bakteri asosiasi mensintesis senyawa metabolit sekunder yang bersifat antibakteri untuk menghambat pertumbuhan kompetitor.

Mekanisme penghambatan dari senyawa antibakteri yang dihasilkan dari isolat bakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dapat terjadi melalui beberapa mekanisme. Mekanisme tersebut melalui penghambatan sintesis dinding sel, penghambatan fungsi membran, penghambatan sintesis protein dan penghambatan sintesis asam nukleat (Jawetz *et al.*, 2001).

Hasil pewarnaan gram dari isolat terpilih S526, S618, dan S621 menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut merupakan kelompok bakteri gram negatif. Menurut Kathiresan dan Bingham (2001), bakteri yang diisolasi dari laut lebih dominan dari kelompok bakteri Gram negatif. Hasil penelitian dari Lisdayanti (2013) dan Jafarzade *et al.* (2013), Bakteri laut yang berasosiasi dengan spons, moluska, rumput laut dan lamun yang menunjukkan aktivitas antibakteri merupakan kelompok bakteri Gram negatif.

Tiga isolat terbaik dan terpilih dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri dari metabolit sekunder yang dihasilkan. Metabolit sekunder yang digunakan dalam pengujian dalam bentuk metabolit ekstraseluler dan metabolit intraseluler hasil inkubasi selama 5 hari. Penggunaan lama waktu inkubasi selama 5 hari dengan tujuan telah mencapai fase stasioner pada kurva pertumbuhan bakteri seperti yang telah dilakukan dalam penelitian Nofiani *et al.* (2009), yang melakukan ekstraksi metabolit sekunder dari bakteri yang berasosiasi dengan spons. Pada fase stasioner diduga terjadi pembentukan senyawa metabolit sekunder karena pada saat fase stasioner ketersediaan nutrisi mulai habis dan jumlah sel bakteri yang hidup dengan jumlah sel bakteri yang mati sebanding. Menipisnya ketersediaan nutrisi merupakan salah satu bentuk kondisi stres lingkungan sehingga bakteri akan membentuk pertahanan diri dengan mensintesis senyawa metabolit sekunder yang bersifat antibakteri

(Nofiani *et al.*, 2009; Sutia, 2011).

Pemanfaatan metabolit sekunder intraseluler dari bakteri dapat dilakukan melalui proses ekstraksi terlebih dahulu. Ekstraksi dilakukan dengan tujuan untuk menarik metabolit intraseluler. Ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut metanol. Pemecahan sel dapat dilakukan melalui maserasi sel bakteri menggunakan pelarut metanol. Metanol dapat menyebabkan pH ekstrasel menjadi asam dan berakibat pada peningkatan konsentrasi proton di dalam sel, akibatnya sel akan menggunakan energi ATP untuk memompa proton keluar sel. Jumlah ATP yang digunakan berbanding lurus dengan jumlah proton yang dipompa keluar. Kondisi seperti ini yang secara terus-menerus akan mengakibatkan terjadinya hambatan pertumbuhan karena sel kekurangan ATP. Sel yang kekurangan ATP tidak mampu memompa proton keluar sel akibatnya proton terakumulasi di dalam sel dan dapat menyebabkan sel lisis. Sel yang lisis akan mengakibatkan senyawa metabolit berdifusi ke pelarut metanol (Nofiani *et al.*, 2009).

Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa kedua jenis metabolit sekunder dari isolat S526 dan S621 menunjukkan aktivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* FNCC 0091 dan *S. aureus* FNCC 0047. Kedua jenis metabolit sekunder dari isolat S526 menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih menghambat *S. aureus* daripada *E. coli*. Kedua jenis metabolit sekunder dari isolat S621 menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih menghambat terhadap *E. coli* daripada *S. aureus*. Perbedaan tersebut diduga karena faktor afinitas dari senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan dari masing-masing isolat terhadap bakteri. Diduga bahwa senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat S526 memiliki tingkat afinitas yang rendah terhadap *E. coli* dan senyawa metabolit sekunder dari isolat S621 memiliki tingkat afinitas yang rendah terhadap *S. aureus*. Afinitas senyawa antibakteri berpengaruh terhadap kecenderungan suatu senyawa untuk membentuk ikatan kimia dengan unsur atau senyawa pada membran suatu bakteri untuk merusak lapisan membran sel. Contoh dari adanya perbedaan afinitas tersebut dapat dilihat dari perbedaan afinitas senyawa antibakteri dari golongan aminoglikosida dan β lactam. Senyawa antibakteri aminoglikosida memiliki afinitas yang rendah terhadap *E. coli* sehingga kemampuan penghambatan senyawa aminoglikosida terhadap *E. coli* rendah tetapi afinitas aminoglikosida lebih tinggi terhadap *S. aureus*. Senyawa antibakteri golongan β lactam memiliki afinitas yang lebih rendah terhadap *S. aureus* sehingga kemampuan penghambatan senyawa β lactam terhadap *S. aureus* rendah tetapi senyawa β lactam memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap *E. coli* (Muttaqien dan Soleha, 2014).

Hasil uji aktivitas antibakteri dari metabolit sekunder S618 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif terhadap *S. aureus*. Kedua jenis metabolit sekunder S618 tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *S. aureus*. Metabolit sekunder dari S618 tidak mampu menghambat bakteri uji diduga karena metabolit sekunder S618 memiliki afinitas yang sangat rendah terhadap *S. aureus*. Rendahnya afinitas yang dimiliki senyawa antibakteri berpengaruh terhadap kemampuan pengikatan dengan unsur kimiawi pada lapisan membran sel dalam merusak lapisan membran (Muttaqien dan Soleha, 2014). Dugaan yang lainnya yaitu metabolit sekunder isolat S618 untuk menghambat bakteri uji tidak mampu menghambat secara individual namun membutuhkan peran kolaborasi antara metabolit intraseluler dengan metabolit ekstraseluler.

Supernatan menunjukkan aktivitas antibakteri karena pada supernatan mengandung senyawa metabolit sekunder yang bersifat antibakteri. Senyawa antibakteri tersebut merupakan hasil dari metabolit ekstraseluler. Metabolit ekstraseluler dikeluarkan di lingkungan media pertumbuhan bakteri sehingga supernatan mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji. Metabolit intraseluler dari isolat-isolat terpilih mampu menunjukkan aktivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Metabolit intraseluler dari isolat-isolat terpilih menunjukkan aktivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Hal tersebut dikarenakan bahwa metabolit intraseluler mengandung senyawa antibakteri. Metabolit intraseluler dari S621 menunjukkan aktivitas antibakteri terbesar dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan metabolit intraseluler dari S526 menunjukkan aktivitas antibakteri terbesar dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Aktivitas antibakteri yang ditunjukkan berupa zona jernih. Semakin besar zona jernih yang dihasilkan semakin besar pula kemampuan senyawa antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Mekanisme penghambatan dari metabolit intraseluler terhadap bakteri uji dapat terjadi melalui mekanisme penghambatan sintesis dinding sel, penghambatan fungsi membran, penghambatan sintesis protein dan penghambatan sintesis asam nukleat (Jawetz *et al.*, 2001). Berdasarkan besarnya zona jernih yang ditunjukkan, aktivitas antibakteri dari kedua metabolit sekunder S526 terhadap *S. aureus* tergolong sangat kuat sedangkan terhadap *E. coli* aktivitas antibakteri metabolit ekstraseluler S526 tergolong kuat dan metabolit intraseluler S526 tergolong sedang. Aktivitas antibakteri dari kedua metabolit sekunder S621 terhadap *E. coli* tergolong kuat sedangkan

aktivitas antibakteri metabolit ekstraseluler S621 terhadap *S. aureus* tergolong sedang dan metabolit intraseluler S621 tergolong kuat. Aktivitas antibakteri dari kedua metabolit sekunder S618 terhadap *E. coli* tergolong kuat. Kategori dan golongan kekuatan senyawa metabolit sekunder tersebut berdasarkan Rao *et al.* (2013), apabila diameter hambatan > 20 mm termasuk kategori sangat kuat, diameter hambatan 10-20 mm kuat, diameter hambatan antara 5-9 mm sedang, dan diameter hambatan < 5 mm lemah.

Hasil uji aktivitas antibakteri dari isolat bakteri secara langsung dengan hasil uji aktivitas antibakteri menggunakan metabolit sekunder menunjukkan hasil yang berbeda. Aktivitas antibakteri dari isolat bakteri lebih menghambat pertumbuhan *S. aureus* FNCC 0047 dan aktivitas antibakteri dari metabolit sekunder lebih menghambat pertumbuhan *E. coli* FNCC 0091. Hasil tersebut dapat terjadi karena pada pengujian aktivitas antibakteri menggunakan isolat bakteri secara langsung, sehingga kedua jenis metabolit sekunder (ekstraseluler dan intraseluler) berperan dalam penghambatan bakteri uji. Pengujian menggunakan metabolit sekunder ekstraseluler dan intraseluler, jenis metabolit sekunder yang berperan dalam menghambat bakteri uji terjadi secara individual. Perbedaan dari masing-masing peran kedua jenis metabolit sekunder baik secara individual atau secara bersama dapat menunjukkan pengaruh yang berbeda.

SIMPULAN

Isolat S611, S526, S621, S618, dan S626 yang berasosiasi dengan kerang pisau (*Solen* sp.) menunjukkan aktivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* FNCC 0091 dan isolat S611, S522, S526, S621, S625 dan S618 menunjukkan aktivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* FNCC 0047. Isolat S621 merupakan isolat yang menunjukkan aktivitas antibakteri terbesar dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* FNCC 0091 dan isolat S618 merupakan isolat yang menunjukkan aktivitas antibakteri terbesar dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* FNCC 0047. Metabolit sekunder isolat S526 dan S621 menunjukkan aktivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* FNCC 0091 dan *S. aureus* FNCC 0047. Metabolit sekunder isolat S618 menunjukkan aktivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* FNCC 0091. Metabolit ekstraseluler S526 menunjukkan aktivitas antibakteri terbaik dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* FNCC 0047 dan metabolit ekstraseluler S621 menunjukkan aktivitas antibakteri terbaik dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* FNCC 0091.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar H, 2009. Bakteri Yang Berasosiasi Dengan Spons *Jaspis* sp.: Analisis Penghasil Senyawa Antimikroba Dan Keragaman Genetiknya. *Tesis*. Tidak Dipublikasikan. IPB: Bogor.
- Burgess GJ, Jordan ME, Bregu M, Spragg-Mearns A, Boyd GK, 1999. Microbial Antagonism: a Neglected Avenue of Natural Products Research. *Journal of Biotechnology*. 70: 217-32.
- Jafarzade M, Yahya NA, Mohamad S, Usup G, Ahmad A, 2013. Isolation and characterization of pigmented bacteria showing antimicrobial activity from Malaysian marine environment. *Malaysian Journal of Microbiology*. 9 (2): 152-160.
- Jawetz M & Adelberg's, 2001. *Medical Microbiology*. McGraw-Hill Companies Inc: California.
- Jha KR & Xu ZR, 2004. Biomedical Compounds from Marine Organisms. *Marine Drugs*. 2: 123-146.
- Kathiresan K & Bingham BL, 2001. Biology of Mangroves and Mangrove Ecosystem. *Advances in Marine Biology*. 40: 81-251.
- Khanna DR, 2010. *Marine Microbial Ecology*. Discovery Publishing House PVT.LTD: New Delhi.
- Lisdayanti E, 2013. Potensi Antibakteri dari Bakteri Asosiasi Lamun (*Seagrass*) Dari Pulau Bonebatang Perairan Kota Makassar. *Skrripsi*. Tidak dipublikasikan. UNHAS.
- Muniarsih T, 2004. Potensi Mikroorganisme Sebagai Sumber Bahan Obat-Obatan dari Laut yang dapat Dibudidayakan. *Oseana*. 29 (1): 1-7.
- Muttaqien EZ & Soleha TU, 2014. Pattern Sensitivity of *Staphylococcus aureus* to Antibiotic Penicilin Period of Year 2008-2013 in Bandar Lampung. *Jurnal Kedokteran*. 1 (1): 1-9.
- Nofiani R, 2008. Urgensi dan Mekanisme Biosintesis Metabolit Sekunder Mikroba Laut. *Jurnal Natur Indonesia*. 10 (2): 120-125.
- Nofiani R, Nurbetty S, Sapar A, 2009. Aktivitas Antimikrobia Ekstrak Metanol Bakteri Berasosiasi Spons dari Pulau Lemukutan, Kalimantan Barat. *E-Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 1 (2). 33: 41.
- Pratiwi TS, 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Pringgencies D, 2009. Biopropeksi Bakteri Symbion dari Gastropoda *Conus miles* Terhadap Strain Bakteri MDR (*Multi Drug Resistant*). *Ilmu Kelautan*. 14 (1): 42-49.
- Pringgencies D, Dananjoyo CM, 2010. Penapisan Bakteri Symbion Gastropoda *Stramonita armigera* Penghasil Senyawa Antibakteri Multi Drug Resistant dari Perairan Ternate. *Jurnal Natur Indonesia*. 13 (3).
- Rao PV, Ravindhnanath K, Kumar KR, 2013. Antibacterial Activity of Novel Substituted Mercaptopurine Derivatives. *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research*. 4(2): 127-131.
- Romalde JL & Barja JL, 2010. *Bacteria in Molluscs: Good and Bad Guys*. *Current Research Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Spain: Formatex.
- Romanenko AL, Uchino M, Kalinovskaya IN, Mikhailov VV, 2008. Isolation, Phylogenetic Analysis and Screening of Marine Mollusc-Associated Bacteria for Antimicrobial, Hemolytic and Surface Activities. *Microbial Research*. 163: 633-644.
- Ruyitno, 2004. *Bakteri Laut dan Peranannya Dalam Mendukung Aktivitas Manusia*. Jakarta: PUSLIT OSEANOGAFI LIPI.
- Sarkono, Faturrahman, Sofyan Y, 2010. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Induk Abalon (*Haliotis asinina*) yang Berpotensi Sebagai Kandidat Probiotik. *Bioteknologi*. 7(2): 99-106.
- Zheng L, Han X, Chen H, Lin W, Yan X, 2005. Marine Bacteria Associated Eith Marine Macroorganisms: The Potential Antimicrobial Resources. *Annals of Microbiology*. 55 (2): 119-124.