

BIOPROSPEKSI BAKTERI YANG BERASOSIASI DENGAN ALGA HIJAU HALIMEDA MACROLOBA, CAULERPA RACEMOSA, DAN ULVA SP SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA ANTI BAKTERI

Rizky Panji Nugroho, Anto Budiharjo, Endang Kusdiyantini

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro,
Tembalang, Semarang 50275 Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690

Abstract

Bacteria can grow in various environments, including those associated with marine organisms such as algae, sponge, sea grass and soft corals. For these organisms, bacteria help building their defense by producing secondary metabolites such as bioactive compound. This research aims to study the potency of the bacteria which interact with green algae *Halimeda macroloba*, *Caulerpa racemosa*, and *Ulva* sp which are able to produce antibacterial compound. Algae, which belong to Chlorophyta, are common to be found in marine water. This research used bacterial isolation, morphologic bacterial isolate characterization, antibacterial test, molecular identification of the antibacterial compound producer isolate, and biochemical activity test. From the isolation, the researcher was able to collect five bacterial isolate; one from *H. macroloba*, three from *C. racemosa*, and one isolate from *Ulva* sp. Of the five isolates, one isolate from *C. racemosa* can prevent the *E.coli*, and one isolate from *H. macroloba* can prevent *E.coli* and *P.aeruginosa*. Isolate derived from *Halimeda macroloba* have the biggest prevention zone ability, which is 18.1 mm, towards *P.aeruginosa*.

Keywords: Antibacterial, Bacterial Association, *Halimeda macroloba*, *Caulerpa racemosa*, *Ulva* sp

Abstrak

Bakteri dapat tumbuh di berbagai lingkungan, termasuk yang berasosiasi dengan organisme laut seperti alga, sponge, lamun dan karang lunak. Keuntungan bagi organisme tersebut yaitu bakteri memberikan kontribusi untuk pertahanan inangnya dengan menghasilkan metabolit sekunder berupa senyawa bioaktif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi bakteri yang berasosiasi dengan alga hijau *Halimeda macroloba*, *Caulerpa racemosa*, dan *Ulva* sp yang mampu menghasilkan senyawa antibakteri. Alga yang termasuk ke dalam jenis Chlorophyta ini banyak ditemukan di perairan laut. Penelitian ini dilakukan dengan isolasi bakteri, karakterisasi isolat bakteri secara morfologi, uji antibakteri, identifikasi secara molekular isolat penghasil senyawa antibakteri, dan uji aktivitas biokimia. Hasil isolasi diperoleh lima isolat bakteri, satu isolat dari *H. macroloba*, tiga isolat dari *C. racemosa*, dan satu isolat dari *Ulva* sp. Dari kelima isolat tersebut, satu isolat dari *C. racemosa* dapat menghambat bakteri *E.coli*, dan satu isolat dari *H. macroloba* dapat menghambat bakteri *E.coli* dan *P. aeruginosa*. Isolat yang berasal dari *Halimeda macroloba* memiliki kemampuan zona hambat terbesar yaitu 18,1 mm terhadap *P. aeruginosa*.

Kata kunci: Antibakteri, Bakteri Asosiasi, *Halimeda maroloba*, *caulerpa racemosa*, *Ulva* sp

Pendahuluan

Di dalam ekosistem laut, bakteri mempunyai fungsi utama sebagai dekomposer senyawa organik. Secara alami bakteri mampu menguraikan semua komponen organik apabila kondisi lingkungannya mendukung (Nuchsin, 2007). Menurut Burgess et al. (1991) Banyak bakteri laut yang hidup bebas maupun yang hidup pada sedimen mampu menghasilkan sejumlah metabolit sekunder yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Dilaporkan bahwa terdapat asosiasi mikroorganisme dengan organisme laut yang juga mensintesa metabolit sekunder seperti organisme inangnya (Watermann, 1999; Burgess et al., 2003).

Penelitian bakteri pada lingkungan laut telah banyak dilakukan seperti isolasi dan identifikasi mikroba simbiosis sponge *Axinella* sp. (Abdullah, 2006). Muliani et al. (2003) mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri asal laut Sulawesi untuk biokontrol penyakit vibriosis pada larva udang windu. Ravikumar et al. (2010) melakukan penelitian yaitu mengenai potensi bioaktif dari bakteri lamun sebagai antibakteri dari bakteri patogen manusia yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dari jenis lamun *Cymodocea serrulata* yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* dan *Streptococcus aeruginosa*, sedangkan Dzeha et al. (2003) menyatakan sebuah senyawa bioaktif yang disebut klonasterol, sebuah triterpenoid dilaporkan terdapat pada *Halimeda macroloba*. Terpenoid berperan sebagai antibakteri yang bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan

polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin.

Pentingnya peran alga dan bakteri yang berasosiasi dalam menghasilkan metabolit sekunder memungkinkan untuk mendapatkan senyawa alternatif sebagai antibakteri. Tujuan dari penelitian ini Isolasi dan identifikasi secara morfologi bakteri yang berasosiasi dengan alga hijau *Halimeda macroloba*, *Caulerpa racemosa*, dan *Ulva* sp dan menguji potensi antibakteri dari isolat bakteri hasil isolasi dari alga hijau tersebut.

Bahan dan Metode

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah pisau/cutter, kantong plastik, erlenmeyer, cawan petri, gelas ukur, bunsen, autoclave, jarum ose, spatula, tabung reaksi, mikropipet, mikrotip, rak tabung reaksi, shaker, vortex, hotplate, gelas beker, batang pengaduk, gelas benda, rak pengecatan, mikroskop, minyak emersi, timer, scalpel, pinset, mortar dan pastel.

Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah *Halimeda macroloba* yang berasal dari Karimun Jawa, *Caulerpa racemosa*, dan *Ulva* sp yang berasal dari Kutuh Bali., media Yeast Extract-Malt Extract Agar (YMA), NB (Nutrient Broth) air laut steril, aquades, alkohol 70%, larutan cat Hucker's Kristal violet, larutan mordan Lugol's iodine, larutan alkohol aseton, larutan cat safranin, dan nystatin.

Metode

a. Isolasi dan Purifikasi Bakteri

Penanaman bakteri yang berasosiasi dengan alga merah dilakukan dengan metode sebaran menurut Madigan (2012). Sampel alga

merah dibersihkan dengan air laut steril dan dihancurkan dengan cara dipotong-potong kecil dan ditumbuk menggunakan mortar dan pastel, selanjutnya 1 gr sampel yang telah cukup halus tersebut dimasukkan ke dalam 9 ml air laut steril, dengan demikian diperoleh pengenceran sampel sebesar 10^{-1} . Dari pengenceran 10^{-1} tersebut diambil 0,5 ml sampel menggunakan mikrotip steril dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 4,5 ml air laut steril dan akan diperoleh pengenceran 10^{-2} . Demikian selanjutnya sehingga diperoleh pengenceran sampel 10^{-5} . Pengenceran seri 10^{-4} dan 10^{-5} tersebut selanjutnya diambil 100 μ l sampel dan disebar ke dalam cawan petri steril berisi YMA yang selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Isolasi bakteri dilakukan dengan metode pour plate. Koloni yang tumbuh diamati warna, ukuran, dan bentuknya. Koloni-koloni bakteri dipisahkan dengan ose bulat berdasarkan warna dan bentuk koloni pada media YMA dalam cawan petri. Isolat yang telah murni disimpan pada YMA miring.

Seluruh isolat murni dilakukan pewarnaan gram. Pewarnaan gram dilakukan dengan membersihkan gelas benda menggunakan alkohol sehingga bebas lemak, kemudian dipanggang di atas nyala Bunsen. Preparat apusan bakteri dibuat dengan mengambil secara aseptik 1 ose suspensi biakan bakteri potensial lalu diratakan di atas permukaan gelas benda kira-kira seluas 1 cm^2 . Jika sudah dingin maka ditetesi dengan cat Gram A secara merata sebanyak 2 – 3 tetes dan didiamkan selama 1 menit. Dicuci dengan air mengalir kemudian dikeringanginkan. Gelas benda ditetesi dengan larutan mordan Gram B, dibiarkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir lalu dikeringanginkan. Selanjutnya dicuci dengan peluntur (Gram C) selama \pm

30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Kemudian diberi larutan cat penutup (Gram D) dibiarkan selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir lalu dikeringanginkan. Gelas benda diamati dengan mikroskop perbesaran kuat menggunakan minyak emersi. Bakteri gram positif berwarna ungu (violet) sedang bakteri gram negatif berwarna merah.

c. Uji antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode agar modifikasi (Radjasa dkk, 2003 dalam Wulandari, 2011). Satu ose bakteri asosiasi alga hijau (chlorophyta) ditanam dalam 5 mL media cair YMA diinkubasi dalam suhu kamar selama overnight. Bakteri uji yang berupa *S. aureus*, *E.coli* dan *P. aeruginosa* ditanam sesuai dengan kerapatan sel 10^5 cfu/mL pada media Nutrient Broth (NB), diambil sebanyak 50 μ L untuk di-spread pada permukaan agar. Kertas cakram steril diletakkan secara aseptis pada permukaan agar, kemudian 5 μ L kultur overnight isolat bakteri asosiasi alga hijau ditetaskan pada kertas cakram dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1-3 hari. Dilakukan pengamatan terhadap zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram dan diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm

Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini menggunakan tiga spesies alga hijau yaitu *Halimeda macroloba* yang berasal dari Karimunjawa, *Caulerpa racemosa*, dan *Ulva* sp yang berasal dari Kutuh Bali. Isolasi bakteri dilakukan terhadap ketiga jenis alga hijau tersebut, didapatkan 5 isolat murni yaitu HM, CR1, CR2, CR3, dan U1. *Halimeda* merupakan jenis alga hijau yang melimpah pada daerah karang diseluruh dunia dan penting dalam penyerapan karbon dari

atmosfer. Halimeda memiliki kemampuan menempel pada batu, karang dan sedimen dengan menggunakan bagian tubuhnya yang disebut holdfast (Larkum et al., 2011). *H. macroloba* merupakan grup makroalga hijau berkapur yang melimpah dan distribusi penyebarannya yang luas di perairan tropis karena mereka mampu berkompetisi dan memiliki tingkat pertumbuhan yang tinggi (Vroom and Smith, 2003; van Tussenbroek and van Dijk, 2007; Sinutok et al., 2008).

Isolat dengan kode CR merupakan hasil isolasi bakteri dari alga *C. racemosa* yang susunan tubuhnya tubular yaitu talus yang memiliki banyak inti tanpa sekat melintang. Dinding selnya mengandung xylan atau mannan. Bentuknya

seperti rambut atau filament. Thallus memiliki stolon agak berukuran besar dengan perakaran yang pendek dan agak rapat. Ramuli timbul pada stolon dengan interval pendek dan memiliki bulatan-bulatan bertangkai pendek/rimbun. Panjang ramuli mencapai 3 cm. Tumbuh pada berbagai substrat di daerah perairan terumbu karang dengan sebaran yang luas (Sulisetjono, 2009).

Ulva sp memiliki struktur lembaran-lembaran tipis yang memiliki warna hijau, alga ini hidup dengan cara menempel pada substrat atau pada organisme lain seperti lamun. Atmadja et al. (1996) menjelaskan *ulva* sp tumbuh melekat pada substrat karang mati di daerah paparan terumbu karang.

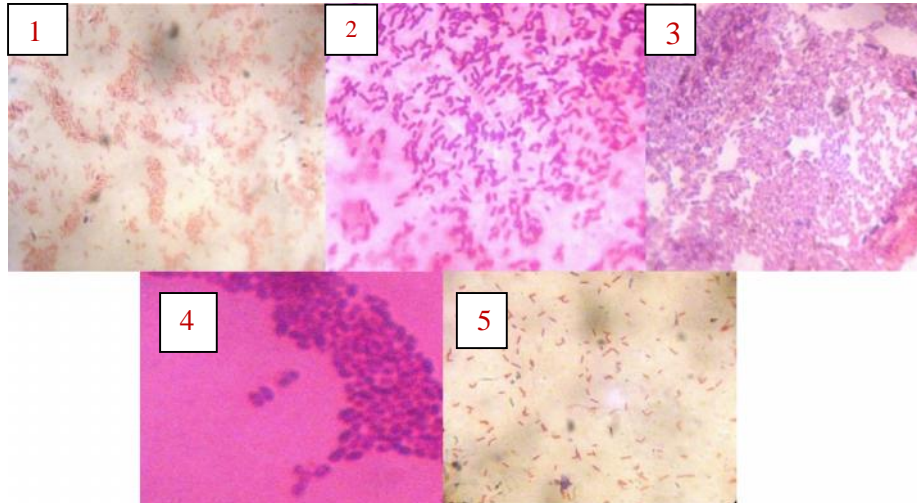
Tabel 1. Morfologi koloni bakteri asosiasi pada agar lempeng dari tiga sampel alga hijau yang berbeda

Isolat	Jenis Alga	Agar Lempeng				
		Tepi	Pigmentasi	Elevasi	Optikal	Bentuk sel
HM	<i>Halimeda macroloba</i>	rata	putih	datar	opaque	Basil
CR1	<i>Caulerpa racemosa</i>	rata	putih	datar	opaque	Basil
CR2	<i>Caulerpa racemosa</i>	rata	putih	datar	opaque	Basil
CR3	<i>Caulerpa racemosa</i>	rata	putih	datar	opaque	Basil
U1	<i>Ulva</i> sp	rata	putih	datar	opaque	Basil

Keterangan: opaque adalah tidak tembus cahaya

Berdasarkan hasil pengamatan morfologinya didapatkan koloni dengan tepian rata pada semua isolat. Kelima isolat memiliki elevasi yang datar, Warna atau pigmentasinya berwarna putih, koloni tersebut memiliki optikan opaque. Pengamatan mikroskopis menunjuk-

kan bakteri dari *H. macroloba* dan *Ulva* sp merupakan bakteri gram negatif, sedangkan bakteri dari *C. racemosa* merupakan bakteri gram positif yang ditandai dengan warna ungu. Hasil pengamatan dapat dilihat pada gambar 2.



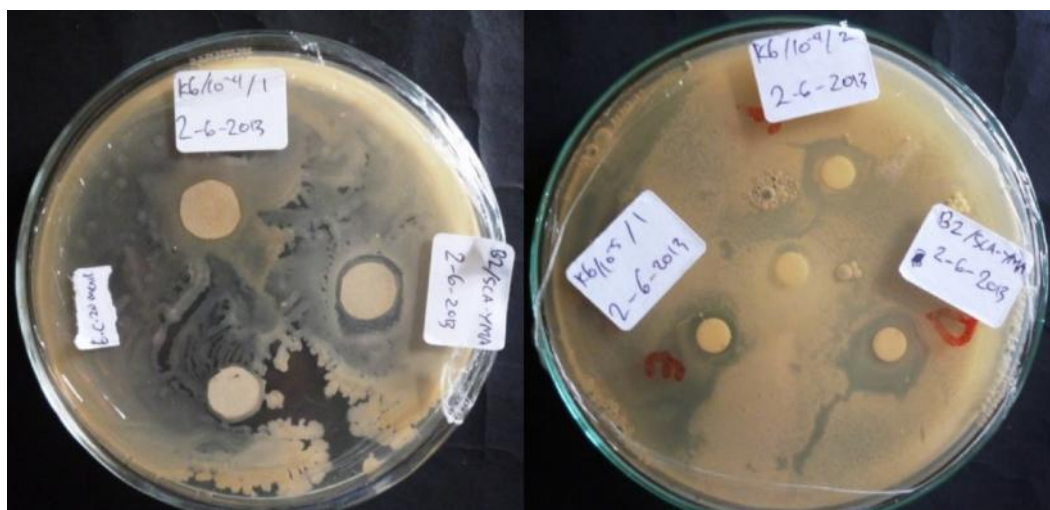
Gambar 2. Hasil pengecatan gram pada kelima isolat bakteri asosiasi alga hijau.
Keterangan : 1: Isolat dari *Halimeda macroloba* ; 2: Isolat dari *Caulerpa racemosa* ; 3: Isolat dari *Caulerpa racemosa* ; 4: Isolat dari *Caulerpa racemosa* ; 5: Isolat dari *Ulva* sp

Pelczar dan Chan (2008) menyatakan bakteri dapat dibedakan menjadi dua golongan, yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif zat lipidnya akan larut selama pencucian dengan alkohol, pori-pori pada dinding sel akan membesar, permeabilitas dinding sel menjadi besar, sehingga zat warna yang sudah diserap mudah

dilepaskan dan bakteri menjadi tidak berwarna. Sedangkan pada bakteri Gram positif akan mengalami denaturasi protein pada dinding selnya oleh pencucian dengan alkohol. Protein menjadi keras dan kaku, pori-pori mengecil, permeabilitas kurang sehingga kompleks ungu kristal jodium dipertahankan dan sel kuman tetap berwarna ungu.

Tabel 2. Aktivitas bakteri alga hijau penghasil antibakteri

Kode Isolat	Zona Hambat		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
HM	-	14,6 mm	18,1 mm
CR1	-	-	-
CR2	-	-	15,3 mm
CR3	-	-	-
U1	-	-	-





Gambar 2. Uji aktivitas antibakteri isolat bakteri alga hijau terhadap *E. coli* (Kiri) dan *P. Aeruginosa* (Kanan). Adanya aktivitas isolat bakteri ditandai dengan adanya zona hambat disekelilingnya

Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambatan pada pertumbuhan bakteri *E. coli*, *S. aureus* dan *P. aeruginosa*. Isolat bakteri HM mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *E. coli* dan *P. aeruginosa* dengan membentuk zona hambatan yaitu sebesar 14,6 mm dan 18,1 mm. Isolat CR1, CR3, dan U1 tidak mampu membentuk zona hambatan pada ketiga jenis bakteri uji. Isolat bakteri CR2 mampu membentuk zona hambatan pada bakteri *P. aeruginosa* sebesar 15,3 mm. Isolat bakteri HM diketahui mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif (*E. coli*). namun tidak ada isolat hasil isolasi yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif (*S. aureus*). Radji (2011) menjelaskan dinding sel bakteri gram positif terdiri atas beberapa lapisan peptidoglikan yang

membentuk struktur yang tebal dan kaku serta mengandung substansi dinding sel yang disebut asam teikoat, sedangkan dinding sel bakteri gram negatif terdiri atas satu atau lebih lapisan peptidoglikan yang tipis dan membran di bagian luar lapisan peptidoglikan, karena hanya mengandung sedikit lapisan peptidoglikan dan tidak mengandung asam teikoat, maka dinding sel bakteri gram negatif lebih rentan terhadap pemberian antibiotik atau bahan antibakteri lainnya. Senyawa antibakteri juga dapat merusak membran sel, Gunawan (2007) menyatakan efek antibakteri dalam merusak membran sel dengan cara bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel bakteri dan bereaksi dengan struktur sterol sehingga mempengaruhi permeabilitas selektif membran.

Kesimpulan

Diperoleh lima isolat bakteri hasil isolasi yaitu satu isolat bakteri dari alga hijau *Halimeda macroloba*, tiga isolat bakteri dari *Caulerpa racemosa*, dan satu isolat bakteri *Ulva sp.* Isolat bakteri *H. macroloba* menghasilkan zona hambat sebesar

18,1 mm terhadap *P. aeruginosa* dan 14,6 mm terhadap *E. coli*. Isolat *C. racemosa* menghasilkan zona hambat sebesar 15, 3 mm terhadap *P. aeruginosa*.

Daftar Pustaka

- Abdullah, A. 2006. Isolasi dan identifikasi mikroba asosiasi sponge *Axinella* sp. Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia. 11(3) : 1-5.
- Atmadja, P.S., Kadi, A., Sulistijo., & Satari, R. 1996. Pengenalan Jenis-Jenis Rumput Laut Indonesia. Jakarta: Puslitbang Oseanologi LIPI.
- Burgess, J.G., Boyd, K.G., Amstrong, E., Jiang, Z., Yan, L., Berggren, M., May, U., Pisacane, T., Granmo, A., & Adams, D.R.. 2003. Development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling* 19:197-205
- Burgess, J.G., Miyashi H, Sudo H, & Matsunaga, T. 1991. Antibiotic production by the marine photosynthetic bacterium *Chromatium pupuratum* NKPB 031704; localization of activity to the chromatopores. *FEMS Microbial Lett.* 84:301-306
- Dzaha, T., M. Jaspars & Tabudravu, J. 2003. Clionasterol, a terpenoid from the Kenyan marine green macroalga *Halimeda macroloba*. *West. Indian Ocean mar. Sci.*, 2: 157-161.
- Gunawan. 2007. Penapisan awal ekstraksi senyawa bioaktif sebagai antibakteri serta uji toksisitas dan uji minimum inhibitory concentration (MIC) dari karang lunak asal perairan Pulau Panggang, Kepulauan Seribu [skripsi]. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Larkum, Anthony W. D., Salih, Anya., Kuhl, Michael. 2011. Rapid Mass Movement of Chloroplasts during Segment Formation of the Calcifying Siphonlean Green Alga, *Halimeda macroloba*. *Plos One* 6(7): e20841
- Madigan, J., David, A.S. & David, P.C. 2012. *Biology of Microorganism*, 13th ed. Benjamin Cummings. USA
- Muliani, A. Suwanto dan Hala, Y. 2003. Isolasi dan karakterisasi bakteri asal Laut Sulawesi untuk biokontrol penyakit vibriosis pada larva udang windu (*Penaeus monodon* fab.). *Hayati* 10 (1): 6-11
- Nuchsin, Ruyitno. 2007. Distribusi Vertikal Bakteri dan Kaitannya Dengan Konsentrasi Klorofil-a di Perairan Kalimantan Timur. *Makara, Sains* 11 (1) : 10-15
- Pelczar, M.J & Chan, E.C.S.. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi* 1. Diterjemahkan oleh R.S. Hadioetomo, T. Imas, S.S. Tjitrosomo, dan S.L. Angka. Penerjemah. UI Press, Jakarta.
- Radji, M. . 2011. *Rekayasa Genetika; Pengantar untuk Profesi Kesehatan*. Sagung Seto: Jakarta.
- Ravikumar, S., Thajuddin N., Suganthi P., Jacob S and Vinodkumar T. 2010. Bioactive Potential of seagrass bacteria against Human bacterial Pathogens. *Journal of Environmental Biology.* 387-389.
- Sulisetjono. 2009. Bahan serahan Alga. Fakultas Saintek Jurusan Biologi. Malang
- Van Tussenbroek, B.I. & van Dijk, J.K. 2007. Spatial and temporal variability in biomass and reproduction of psammophytic *Halimeda* *incrassata* (Bryopsidales, Chlorophyta) in a Caribbean reef lagoon. *Journal of Phycology.* 43: 69-77.
- Vroom, P.S. & Smith, C.M. 2003. Life without cells. *Biologist.* 50:222-226.
- Watermann, B. 1999. Alternative antifoulant techniques present and future. *LimnoMar:* 1-6.

Wulandari, R. 2011. Potensi dan Karakterisasi Bakteri Karang sebagai Antibakteri White Plague Disease Tipe I pada Karang yang Diisolasi dari Perairan Karimunjawa. Skripsi. Jurusan Biologi FMIPA UNDIP, Semarang.