



Karakterisasi Metabolit Sekunder Bakteri Simbion Gastropoda *Conus miles* dengan Metode GC-MS Sebagai Antibakteri MDR (*Multi Drug Resistant*)

Nurul Fitrah Hasanah, Delianis Pringgenies, Sri Yulina Wulandari

*Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Kampus Tembalang, Semarang 50275 Telp/Fax. 024-7474698*

ABSTRAK

Telah diketahui bahwa bakteri simbion yang bersimbiosis dengan gastropoda *Conus miles* memiliki potensi yang mampu menghasilkan senyawa antibakteri terhadap bakteri MDR (*Multi Drug Resistant*). Informasi yang ditemukan sebelumnya dari isolasi bakteri simbion dan berdasarkan hasil skrining, besar kecilnya zona hambat dan sifat penghambatannya terhadap beberapa jenis bakteri uji memperlihatkan bahwa isolat yang berasal dari simbion Gastropoda *Conus miles* memiliki karakteristik dengan tingkat kekerabatan sebesar 98% pada bakteri *Pseudoalteromonas* sp. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui karakteristik senyawa bioaktif bakteri simbion yang berasosiasi dengan Moluska jenis *Conus miles*. Penelitian dilakukan tiga tahap yakni isolasi dan pemurnian bakteri; identifikasi karakterisasi isolat melalui hasil reaksi pada uji fisiologis dan uji biokimia; serta identifikasi senyawa metabolit sekunder dengan metode GC-MS QP2010S SHIMADZU. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa isolat bakteri simbion memiliki sejumlah senyawa dengan persentase puncak senyawa tertinggi hingga terendah yakni senyawa, Acetic acid (CAS) Ethylic acid (35.22%); Propanoic acid, 2-methyl-(CAS) Isobutyric acid (11.78%); Iso-valeric acid (9.38%); Butanoic acid, 2-methyl-(CAS) 2-methylbutanoic acid (4.74%); dan 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dioctyl ester (CAS) Dioctyl phthala (4.36%). Hasil penelitian disimpulkan bahwa isolat bakteri simbion yang diperoleh dalam penelitian ini memberikan informasi hasil yang berpotensi sebagai antibiotik baru.

Kata kunci : *Bakteri simbion, anti-bakteri, senyawa bioaktif.*

ABSTRACT

It is known that the bacterial symbionts are symbiotic with gastropods *Conus miles* has the potential to be able to produce antibacterial compounds against bacterial MDR (*Multi Drug Resistant*). Information found previously from bacterial symbionts and isolation based on screening results, the size of the zone of inhibition and inhibitory properties against several types of bacteria tests showed that isolates derived from *Conus miles* Gastropoda symbionts characterized by kinship rate of 98% in bacteria *Pseudoalteromonas* sp. The research objective was to determine the characteristics of the bacterial symbiont bioactive compounds associated with the type of mollusk *Conus miles*. The study was conducted three phases namely the isolation and purification of bacteria; characterization of isolates identified through test results on the reaction of physiological and biochemical tests, as well as the identification of secondary metabolites by GC-MS method QP2010S Shimadzu. The results showed that the bacterial symbiont isolates had a number of compounds with a percentage of the highest peak to the lowest compound the compound, Acetic acid (CAS) ethylic acid (35.22%); propanoic acid, 2-methyl-(CAS) Isobutyric acid (11.78%); Iso-valeric acid (9:38%), butanoic acid, 2-methyl-(CAS) 2-methylbutanoic acid (4.74%) and 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dioctyl ester (CAS) Dioctyl phthala (4:36%). The results concluded that the bacterial symbiont isolates obtained in this study provide information on the results of potentially new antibiotics.

Keywords: *Bacterial symbionts, anti-bacterial, bioactive compounds.*

Pendahuluan

Biota laut (*marine organism*) merupakan sumber bahan alam yang sangat kaya dengan aktivitas biologi yang unik. Beberapa diantaranya mempunyai aktivitas antifungi dan antitumor. Disamping itu ada juga yang mempunyai aktivitas sebagai stimulan kekebalan dan penghambat enzim tertentu. Selama 30 tahun terakhir, lebih dari 7000 senyawa aktif berhasil diisolasi dari biota laut dan digunakan sebagai rujukan dalam pengembangan obat baru (Edrada, 1998).

Seperti dinyatakan oleh Watermann, 1999; Burgess *et al.* (2003) bahwa mikroorganisme yang berasosiasi dengan organisme laut akan mensintesa metabolit sekunder seperti yang dihasilkan oleh organisme inangnya. Senyawa halichondrin B misalnya, merupakan salah satu contoh senyawa alam dari laut dengan struktur sangat kompleks yang hanya dapat diisolasi dari organisme penghasilnya. Organisme yang dapat dikulturkan dalam jumlah besar, merupakan kondisi yang ideal untuk dilakukan eksplorasi kandungan senyawa kimia, beberapa di antaranya adalah mikroorganisme laut.

Keberadaan bakteri yang berasosiasi dengan moluska laut telah memungkinkan penggunaan jenis bakteri tersebut sebagai sumber utama bakteri yang baru. Bukti-bukti ilmiah menunjukkan bakteri-bakteri yang berasosiasi dengan gastropoda jenis *Conus miles* mempunyai peranan dalam produksi senyawa bioaktif sehingga menjadi landasan dalam pencarian senyawa antimikroba dari bakteri yang berasosiasi dengan Moluska (Pringgenies *et al.*, 2008).

Kandungan senyawa metabolit sekunder yang termasuk ke dalam golongan metabolit telah terbukti bekerja sebagai derivat antibakteri. Penelitian ini difokuskan untuk mencari senyawa bioaktif yang terdapat pada mikroorganisme laut terutama bakteri simbiosis yakni bakteri yang berasosiasi dengan biota lain. *Conus miles*, salah satu spesies dari jenis gastropoda menjadi suatu objek penelitian yang menarik, yakni adanya racun yang memiliki efek mematikan terhadap biota

lain termasuk manusia (Islami, 2008). Berdasarkan fakta inilah perlu dilakukan penelitian lain mengenai potensi senyawa bioaktif terutama bakteri simbiosis yang terdapat didalam *Conus* untuk manfaat lain khususnya sebagai antibakteri MDR. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui karakteristik senyawa bioaktif bakteri yang berasosiasi dengan gastropoda jenis *Conus miles* dengan menggunakan metode GC-MS.

Materi dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan selama 6 bulan, yaitu pada bulan Juli 2009 – Januari 2010, yang meliputi Isolasi dan pemurnian bakteri yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Institut Obat Bahan Alam, Universitas Diponegoro. Uji biokimia dan karakterisasi bakteri; dan Identifikasi senyawa metabolit sekunder dengan menggunakan analisa GC-MS yang dilakukan di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI(Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia) Bogor.

Materi penelitian yang digunakan, yaitu Isolat bakteri yang berasosiasi dengan gastropoda jenis *Conus miles*, yang diperoleh dari Perairan pulau Bastiong Kepulauan Ternate, Maluku. Hasil seleksi dari isolat bakteri simbiosis ini yang sudah dilakukan sebelumnya memperlihatkan bahwa terdapat adanya isolat yang dianggap paling berpotensi untuk dijadikan sebagai sumber antibiotik baru berdasarkan konsistensi hasil skrining, besar kecilnya zona hambat yang dihasilkan dan sifat penghambatannya pada uji terhadap beberapa jenis bakteri patogen klinik (MDR) jenis Klebsiella, E.coli, Coagulase Negatif Staphylococcus (CNS), Enterobacter 5, Enterobacter 10 dan Pseudomonas.

Amplifikasi DNA dari isolat bakteri simbiosis yang sudah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa isolat menghasilkan *single band* (pita tunggal) dengan ukuran sekitar 1500 bp sesuai dengan perbandingan menggunakan marker DNA. Hasil analisis homologi menggunakan *BLAST searching* menunjukkan bahwa isolat TCM 6.1 memiliki prosentase kesamaan

tertinggi dengan genus *Pseudoalteromonas* sp. (99%). Hasil penelitian ini dilanjutkan untuk mengetahui karakterisasi isolat bakteri simbiosis dengan menggunakan uji biokimia dan analisis senyawa yang terdapat dalam isolat dengan analisis Gas Chromatography – Mass Spectrometer (GC-MS).

Uji biokimia

Pada uji ini dilakukan beberapa tahap pengujian yakni uji Motilitas untuk mengetahui kemampuan pergerakan bakteri; uji Indole dengan cara mengamati perubahan warna yang terjadi setelah penambahan reagen Kovacs kedalam media *Tryptone Soya Broth* (TSB) yang telah diinokulasikan isolat bakteri selama 1-2 hari; uji Oksidase dengan cara mengamati perubahan warna pada kertas filter yang telah dibasahi oleh reagen oksidase disekitar area yang diolesi dengan biakan bakteri. Uji VP (Voges-Proskauer) untuk menguji adanya 2,3 butadiol yang dihasilkan oleh bakteri dengan cara penambahan reagen 5% α -naphthol didalam ethyl alcohol absolut dan 40% KOH-Creatine. Uji Nitrat untuk menentukan kemampuan bakteri dalam mereduksi nitrat menjadi nitrit, dengan cara penambahan reagen 0,8% sulfanilic acid; 0,6% α -naphthylamine; dan serbuk zink kedalam medium Nitrate broth yang telah ditanami isolat.

Uji Urease untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghidrolisa urea menjadi amoniak karena adanya bakteri yang dapat mensintesa enzim urease dengan cara menginokulasikan isolat bakteri pada media urea dengan suhu 35°C selama 24 jam. Uji ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -galactoside) adalah uji untuk menunjukkan adanya enzim β -galactoside untuk membedakan fermentasi laktosa dari non-fermentasi laktosa organisme dengan menggunakan kultur dari media TSI (*Triple Sugar Iron*) yang mengandung *lactose* pada suhu 36°C selama 20 menit sampai dengan 1 jam yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning pada media tabung apabila

reaksi positif. Uji Simon citrat dilakukan dengan cara biakan bakteri diinokulasikan kedalam medium Simmon's Citrate Agar dengan cara goresan menggunakan jarum ose steril selama 1-4 hari, untuk menguji kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon utama bagi bakteri. Uji Casein untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghancurkan chitin (mencerna) karena mempunyai enzim chitinase dengan cara media yang sudah dicampur dengan chitin ditanami dengan bakteri dan diinkubasi selama 2-4 hari yang ditandai dengan terbentuknya daerah yang jernih disekitar pertumbuhan bakteri.

Analisis Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS)

Analisis GC-MS dilakukan menggunakan GC-MS QP2010S Shimadzu dengan kondisi analisis sebagai berikut: kolom berjenis Rtx-5MS 30mm dan diameter internal 0,22mm. Gas pembawa yang digunakan Helium dengan tingkat temperatur injektor 320°C, tekanan 13,7 kPa, aliran total 40mL/menit, aliran kolom 0,5mL/menit, kecepatan linier 25,90 cm/detik, *purge flow* 3 mL/menit, *split ratio* 73,0 dan temperatur kolom terprogram dari 70°C (dipertahankan selama 5 menit) hingga 300°C (dipertahankan selama 52 menit) dengan laju kenaikan temperatur sebesar 10°C /menit, temperatur sumber ion 250°C dan *interface temperature* 320°C.

Jumlah senyawa yang terdapat dalam ekstrak ditunjukkan oleh puncak (*peak*) pada kromatogram sedangkan nama/jenis senyawa yang ada diinterpretasikan berdasar data spektrum dari tiap puncak dengan menggunakan metode pendekatan pustaka pada database GC-MS (Hendayana, 1994 dalam Pringgenies, 2010).

Hasil dan Pembahasan

Uji skrining terhadap isolat bakteri simbion gastropoda *Conus miles* dari perairan pulau Bastiong Kepulauan Ternate, Maluku telah dilakukan. Hasil ini dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri aktif yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan hasil yang sangat menjanjikan karena isolat mampu menghambat bakteri MDR lebih dari satu jenis yang meliputi *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *E.coli*, dan *Enterobacter* (Pringgenies, 2010). Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa isolat TCM 6.1 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Pseudoalteromonas* sp. Anggota dari Alteromonadales telah dikenal sebagai produser dominan antibiotik (Long and

Azam, 2001; Grossat *et al.*, 2004). Lebih lanjut Radjasa *et al* (2007) melaporkan aktivitas antibakteridari bakteri *Pseudoalteromonas luteoviolacea* TAB 4.2 yang berasosiasi dengan karang keras *Acropora* sp. aktif menghambat pertumbuhan bakteri karang dan patogen. Bakteri genus *Pseudoalteromonas* diketahui memiliki fragmen gen non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) yang diketahui mampu menghasilkan siderophore Alterobactin (Deng *et al.*, 1995 dalam Pringgenies, 2010). Hasil uji biokimia bakteri simbion gastropoda *Conus miles* (Tabel 1) :

Tabel 1. Hasil Uji Biokimia Isolat Bakteri TCM 6.1

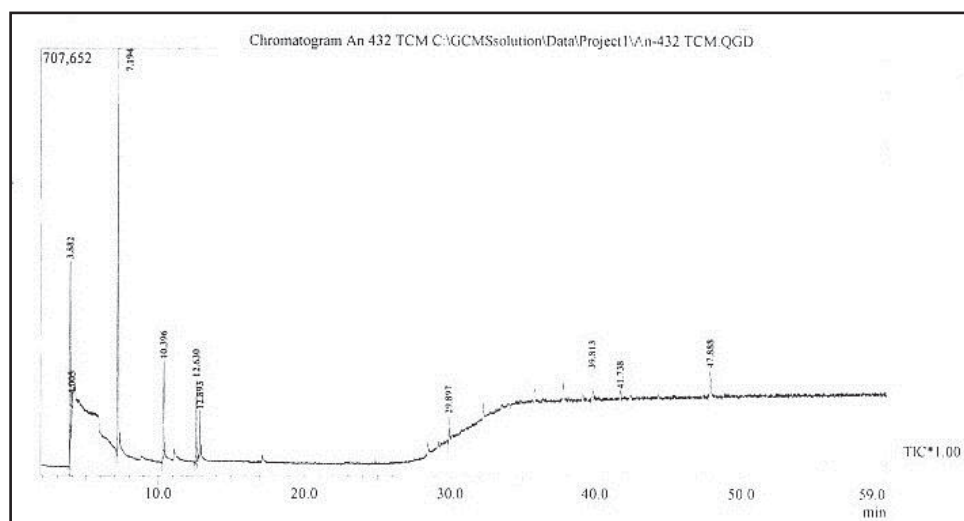
Perlakuan / Uji	Isolat Bakteri TCM 6.1
Pewarnaan Gram	+
Bentuk Koloni	Besar Panjang
Spora	+
Bentuk Spora	Sub Terminal/Central
Panjang cell	< 3µm
Motilitas	+
Aerobik	+
An aerobik	-
Uji Katalase	+
Uji Oksidase	+
Uji Glukosa	-
Hugh Leifson (O/F)	-
10% NaCl	-
Reduksi Nitrat	+
Uji Indole	-
Uji ONPG	-
VP	+
50° C	-
Citrate	-
Glukosa Acid	+
Hidrolisis :	
Starch	+
Urea	-
Casein	+

Pada hasil uji biokimia, diketahui salah satu karakteristik dari isolat bakteri adalah tidak terdapatnya aktivitas produksi enzim triptofanase dari bakteri. Hal ini terlihat pada hasil uji Indole yang bersifat negatif ditandai dengan tidak terbentuknya lapisan (cincin) berwarna merah muda pada permukaan biakan. Asam amino triptofan merupakan komponen asam amino yang lazim terdapat pada protein, sehingga asam amino ini dapat digunakan oleh mikroorganisme akibat penguraian protein.

Karakteristik lain yang terdapat pada isolat adalah bahwa bakteri jenis ini

memiliki enzim katalase yang berperan dalam aktivitas bakteri menguraikan H₂O₂ (Hydrogen peroxide) yang bersifat racun, terlihat dalam pengujian biokimia uji katalase.

Analisis GC-MS dilakukan pada isolat aktif TCM 6.1 sebagai fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri terbaik. Pendugaan senyawa dilakukan dengan menggunakan Gas Chromatography menunjukkan terdapat beberapa puncak senyawa dengan tingkat prosentase dan waktu tambat seperti tertera pada Gambar 1 dan Tabel 2.



Gambar 1. Kromatogram GC-MS Hasil Isolat bakteri TCM 6.1

Tabel 2. Waktu Tambat dan Konsentrasi Metabolit Sekunder Hasil Analisa GC-MS

Puncak	Waktu Retensi	Area	Kons. (%)	Nama Senyawa
1	3.882	1397641	23.66	Nitrogen oxide (N ₂ O) (CAS) Nitrous oxide
2	4.005	156652	2.65	1,3-Dioxolane, 2-(6-octynyl)-(CAS)
3	7.194	2080870	35.22	Acetic acid (CAS) Ethylic acid
4	10.396	696112	11.78	Propanoic acid, 2-methyl-(CAS) Isobutyric acid
5	12.630	554295	9.38	Iso-VALERIC ACID
6	12.893	280034	4.74	Butanoic acid, 2-methyl-(CAS) 2-methylbutanoic acid
7	29.897	163630	2.77	1-Pentadecanol (CAS) Pentadecanol
8	39.813	257827	4.36	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dioctyl ester (CAS) Dioctyl phthala
9	41.738	120556	2.04	Tetradecane, 1-iodo-
10	47.888	200680	3.40	Cholestane, 3-thiocyanato-, (3.alpha.,5.alpha.)-(CAS) Thiocyanic acid, .5.alp

Hasil GC-MS pada sampel fraksi TCM memperlihatkan bahwa pada fraksi terdeteksi 10 puncak utama, tetapi hanya 3 senyawa utama tertinggi yang lebih dominan yakni Acetic acid (CAS) Ethylic acid, Propanoic acid, 2-methyl-(CAS) Isobutyric acid dan Iso Valeric acid.

Senyawa acid memperlihatkan senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri dengan cara menghancurkan dinding sel dan menghambat sintesis dinding sel (Mutchler, 1991). Diduga senyawa acid tersebutlah yang berperan memiliki kemampuan antibakteri (Kim *et al.*, 2004). Acetic acid, diproduksi dan diekskresikan oleh bakteri asam asetat, yang terkenal pada genus *acetobacter*, *Clostridium acetobutylicum*. Acetic acid berperan sebagai agen antibakteri ringan seperti yang dinyatakan oleh Hillenga *et al.*, (1995), Asam Benzenasetat digunakan dalam pembuatan Penicilin G. dan Asam Benzen-asetat mempunyai kemampuan untuk menembus membran plasma pada sel.

Kesimpulan

Isolat bakteri yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan hasil yang sangat berpotensi karena isolat mampu menghambat bakteri MDR. Hasil GC-MS pada sampel fraksi terdapat 10 puncak senyawa dengan 3 senyawa yang lebih dominan yakni Acetic acid (CAS) Ethylic acid, Proanoic acid, 2-methyl-(CAS) Isobutyric acid, dan Iso Valeric acid.

Isolat TCM bakteri simbiosis gastropoda *Conus miles* memberikan kontribusi sebagai sumber alternatif baru metabolit sekunder dari bahan farmasi laut dalam menghasilkan produk sebagai desinfektan.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional, Hibah Kompetensi 2010. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Ir. Delianis Pringgenies, M.Sc Jur. Ilmu Kelautan FPIK UNDIP Semarang. Kepada reviewer Jurnal Penelitian Kelautan disampaikan penghargaan atas review yang sangat berharga pada artikel ini.

Daftar Pustaka

- Burgess J.G., K.G. Boyd, E. Amstrong, Z. Jiang, L. Yan, M. Berggren, U. May, T. Pisacane, A. Granmo, and D.R. Adams, 2003. Development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling*, 19:197- 205
- Hendayana, S. 1994. Kimia Analitik Instrumen, Edisi kesatu, IKIP Press, Semarang, hal. 219 dan 243.
- Kim TK, MJ Garson, and J A Fuerst. 2005. Marine actinomycetes related to the *Salinospora* group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. *Environ. Microbiol.*, 7:509-518
- Long R, and F. Azam, 2001. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Appl Environ Microb.*, 67:4975-4983
- Proksch, P., R.A. Edrada, and R. Ebel. 2002. Drugs from the sea-current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Bio-technol.*, 59:125-134.
- Pringgenies, D, O.K. Radjasa, dan A. Sabdono. 2008. Bioprospeksi Moluska dan Bakteri Simbiosisnya Dalam Rangka Penanganan Strain MDR (Multi Drug Resistant. Program Intensif Riset Dasar 200/2008. Lembaga Penelitian Univeristas Diponegoro. November 2008. Laporan Penelitian. 40 Hal.
- Pringgenies, D. Karakterisasi Senyawa Bioaktif Bakteri Simbiosis Moluska dengan GC-MS. Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis, Vol.2, No.2, Hal.34-40, Desember 2010
- Sukarmi dan O.K. Radjasa. 2007. Biotechnical Consideration in the Search for Bioactive Compounds from Reef's Invertebrates. *J. Appl. Sci.*, 7(8): 1235-1238
- Watermann, B. 1999. Alternative antifoulant techniques present and future. *Limno. Mar.*, 1(6):6-7