

KARAKTERISASI BAKTERI SIMBION KARANG LUNAK DARI PULAU PANJANG TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI MULTI DRUG RESISTEN TUBERKULOSIS (MDR-TB)

Yuvianti Dwi Franyoto¹, Ahmad Fuad Masduqi¹, Dwi Nur Setyasih², Sakti Muchlisin³, Lia Kusmita^{1*}

¹STIFAR “Yayasan Pharmasi Semarang”

²Bagian Mikrobiologi, Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Tengah

³Tropical Marine Biotechnology, Universitas Diponegoro

*email: lia_kusmita@yahoo.com

ABSTRAK

Mycobacterium tuberculosis adalah bakteri yang menginfeksi sepertiga penduduk dunia. Diperkirakan 8 juta penduduk dunia diserang tuberculosis. Penyakit tuberculosis menyebabkan kematian 3 juta orang pertahun. Pengobatan tuberculosis saat ini ternyata tidak memberikan efektivitas yang tinggi karena munculnya strain MDR *Mycobacterium tuberculosis*. Oleh karenanya, bahan aktif baru diharapkan dapat mengatasi masalah tersebut. Bakteri simbion karang lunak merupakan salah satu sumber yang diharapkan dapat mengatasi masalah tuberculosis. Hal ini karena bakteri simbion karang lunak memiliki senyawa bioaktif yang sama dengan inangnya. Bakteri simbion diisolasi dari karang lunak yang diisolasi dari Pulau Panjang. Pada penelitian ini dilakukan pengujian bakteri simbion karang lunak terhadap pertumbuhan Multi drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain rifampicin dan SIRE (streptomisin, isoniazid, rifampicin, dan ethambutol). Dari 25 bakteri simbion yang diisolasi, ada 4 bakteri yang memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri MDR TB strain SIRE dan Rifampicin. Hasil identifikasi molekuler dilakukan dengan menggunakan PCR 16S DNA, dimana bakteri P.S2 1, P.Sa 1, P.Lo 2, dan P.Lo 3 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Ponticoccus gilvus*, *Janibacter indicus*, *Virgibacillus marismortui* dan *Brachybacterium canglomeratum*

Kata Kunci: bakteri simbion, karang lunak, antibakteri, MDR TB

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis has infected a third of the world population. The incidence of Pulmonary Tuberculosis in countries are approximately 8 million people. They are infected by Pulmonary Tuberculosis with 3 million of death rate per year. Treatment for tuberculosis mostly not effective because Multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) cases is very high. Therefore, it is necessary to discover new antimicrobial compounds which can be used to control Multidrug resistant tuberculosis. Symbiotic bacteria of softcoral are one promising source. This is because symbiotic bacteria of softcoral have the same bioactive compounds as their host. *Symbiotic bacteria were isolated from softcoral collected from Panjang Island. The symbiotic bacteria screened for antibacterial activity against Multi drug resistant Mycobacterium tuberculosis strain rifampicin and SIRE (streptomisin, isoniazid, rifampicin, and ethambutol). Four of twenty five symbiotic bacteria was active against MDR TB strain SIRE and Rifampicin. The molecular identification based on partial 16S DNA, that active isolate P.S2 1, P.Sa 1, P.Lo 2, and P.Lo 3 was closely related to Ponticoccus gilvus, Janibacter indicus, Virgibacillus marismortui and Brachybacterium canglomeratum.*

Keywords: symbiotic bacterial, softcoral, Antibacterial, MDR TB

1. PENDAHULUAN

Multi drug resistant TB (MDR TB) adalah resistensi terhadap dua agen anti-TB lini pertama yang paling poten yaitu isoniazide (INH) dan rifampisin (Widyasrini, dkk., 2017). MDR TB berkembang selama pengobatan TB ketika mendapatkan pengobatan yang tidak adekuat. Hal tersebut terjadi karena beberapa alasan, misalnya; pasien yang merasa lebih baik dan menghentikan pengobatan, persediaan obat TB habis atau langka, atau pasien lupa meminum obat. Pada awalnya resistensi ini muncul sebagai akibat dari ketidakpatuhan pasien dalam menjalani pengobatan. Selanjutnya transmisi strain MDR TB dapat menyebabkan terjadinya kasus resistensi primer. Tuberkulosis paru dengan resistensi dicurigai kuat jika kultur basil tahan asam (BTA) tetap positif setelah terapi 3 bulan atau kultur kembali positif setelah terjadi konversi negative (Buntuan, 2014).

Pencarian bahan – bahan antibakteri tuberkulosis baru perlu dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut. Bahan antibakteri tuberkulosis dapat berasal dari zat bioaktif yang terdapat pada ekstrak tumbuhan, hewan serta zat-zat bioaktif yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Beberapa jenis karang lunak mengandung senyawa bioaktif yang bersifat antibiotik.

Senyawa antibiotik pada karang lunak tentu bersifat antibakteri, tetapi jika karang

lunak diambil secara besar-besaran untuk dijadikan bahan antibakteri akan bertentangan dengan kepentingan konservasi. Karang lunak hidupnya bersimbiosis dengan berbagai jenis bakteri. Bakteri yang bersimbiosis dengan organisme akan melakukan interaksi biokimia dengan organisme inangnya. Interaksi biokimia tersebut menyebabkan bakteri yang bersimbiosis menghasilkan zat bioaktif yang sama dengan inangnya. Sehingga beberapa jenis bakteri yang bersimbiosis dengan karang lunak diperkirakan dapat menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang dapat digunakan sebagai bahan anti bakteri (Lee, et al. 2001).

2. METODE

2.1 Metode Sampling

Metoda sampling yang akan digunakan adalah metoda sampling purposif, dimana sampel karang lunak akan diambil dari lokasi Pulau Panjang, Jepara Jawa Tengah.

2.2 Dokumentasi dan Identifikasi

Dokumentasi terhadap sampel invertebrata dilakukan dengan cara mengambil gambar secara *in situ* dengan *underwater camera* Canon S50 dan pengambilan gambar pada permukaan segera setelah sampel diambil dari laut. Identifikasi akan dilakukan terhadap semua spesies karang.

2.3 Isolasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Karang

Isolasi bakteri dilakukan dengan metoda sebaran (Radjasa et al, 2007a,b). Sampel invertebrata tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang sebagian telah diisi air laut steril. Selanjutnya dilakukan pemotongan terhadap permukaan jaringan dan hanya bagian dalam dari sampel yang akan digunakan.

Selanjutnya dilakukan seri pengenceran terhadap sampel tersebut. Dari masing-masing cawan petri tersebut diambil 10 ml sampel dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam labu erlemeyer yang berisi 90 ml air laut steril dan akan diperoleh pengenceran sampel sebesar 10^{-1} . Dari pengenceran 10^{-1} tersebut diambil 1 ml sampel dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml air laut steril dan akan diperoleh pengenceran 10^{-2} . Demikian selanjutnya sehingga akan diperoleh pengenceran sampel 10^{-3} ; 10^{-4} ; dan 10^{-5} .

Dari masing-masing seri pengenceran tersebut, selanjutnya diambil 1 ml sampel dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang dituangi media agar Zobell 2216E. Cawan petri tersebut kemudian diinkubasikan pada suhu 30°C selama 2 hari. Koloni bakteri berwarna yang tumbuh pada permukaan agar tersebut, kemudian dipisahkan dengan teknik goresan (*streak method*) sehingga diperoleh isolat bakteri

berwarna yang berasosiasi dengan invertebrata.

2.4 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas dari bakteri symbion karang lunak terhadap bakteri tuberkulosis dilakukan dengan menggunakan metode overlay. Bakteri tuberkulosis (strain rifampicin dan SIRE) digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Tengah-Semarang. Kultur setiap bakteri dalam fase logaritmik, kemudian campur dengan Middle brook 7H9 + OADC yang dituangkan ke permukaan agar yang sebelumnya diinokulasikan bakteri symbion karang lunak. Inkubasi selama 4 hari di suhu kamar. Aktivitas antibakteri dilihat dari pembentukan zona hambat di sekitar bakteri tuberkolosis (Sulistiyani, dkk., 2010)

2.5 Amplifikasi PCR dan sekuensing DNA

Isolat bakteri dikultur pada 5 ml medium cair ZoBell 2216E pada suhu 20°C selama 24 jam, kemudian dipanen dengan sentrifugasi, selanjutnya dicuci dan disuspensi dengan akuades steril. Ekstraksi DNA dilakukan dengan cara 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 tersebut dipanaskan pada suhu 60°C selama 20 menit dan 100°C selama 10 menit. Selanjutnya, campuran didinginkan secara cepat dalam es selama 10 menit dan

disentrifugasi selama 5 menit pada 8000 rpm (Radjasa et al, 2007a).

Perlakuan suhu yang digunakan pada PCR ini adalah: denaturasi pada 94°C selama 3 menit, kemudian 30 siklus (*annealing* pada 55°C selama 60 detik, *extension* pada 72°C selama 90 detik dan denaturasi kembali pada 94°C selama 40 detik), serta 42°C selama 1 menit, 72°C selama 5 menit dan terakhir ~4°C. Primer yang digunakan untuk PCR 16S rDNA adalah primer universal 27^F (5'-AGAGTTTGATCMTG GC TCAG-3') dan primer spesifik *eubacteria* 1492R (5'-TACG GYTACCTTGTTACGACTT-3') (Isnansetyo dan Kamei, 2003).

Amplifikasi DNA dilakukan dengan pengkodisian alat (96°C selama 2 menit),

selanjutnya sebanyak 25 siklus dengan ketentuan denaturasi (96°C selama 10 detik); *annealing* (50°C selama 5 detik); dan reaksi pemanjangan (*extension reaction*) (60°C selama 4 menit). Hasil PCR dipurifikasi dan diruntut menggunakan primer 765R dan 1114R. Hasil peruntutan dianalisis secara otomatis (ABI 3130XL, *Applied Biosystem*).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel atau bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah karang lunak yang berasal dari perairan Pulau Panjang Jepara Jawa Tengah. Berikut spesies dari sampel yang akan digunakan untuk penelitian ini:

Tabel 1. Kode Sampel dan Jenis Karang Lunak yang Digunakan.

No	Kode Sampel	Keterangan
1.	P.Si	Pulau Panjang <i>Sinularia</i>
2.	P.S2	Pulau Panjang (Family <i>Plexauridae</i>)
3.	P.Sa	Pulau Panjang <i>Sarcophyton</i>
4.	P.Cl	Pulau Panjang <i>Cladiella</i>
5.	P.Lo	Pulau Panjang <i>Lobophytum</i>
6.	P.S1	Pulau Panjang Soft Coral

Karang lunak tersebut diisolasi bakterinya dengan menggunakan media agar miring. Dari hasil isolasi bakteri simbion dari karang

lunak diperoleh 25 bakteri seperti tabel dibawah ini:

Tabel 2. Isolat Bakteri Simbion Karang Lunak dari Perairan Pulau Panjang.

No	Kode	Nomor Isolat	Warna	Bentuk	Permukaan	Tepi
1	P.Si	1	Kuning	Bulat	Melengkung	Utuh
		2	Putih	Bulat	Melengkung	Utuh
		3	Putih	Tak Teratur	Melengkung	Berombak
		4	Putih tulang	Tak Teratur	Melengkung	Berombak
2	P.S2	1	Orange	Bulat	Melengkung	Utuh
		2	Putih	Bulat	Rata	Utuh
		3	Orange	Bulat	Rata	Berombak
		4	Putih	Bulat	Rata	Berombak
		5	Putih	Titik-titik	Melengkung	Utuh
		6	Putih	Bulat	Melengkung	Bergerigi
3	P.Sa	1	Putih kekuningan	Bulat	Rata	Utuh
		2	Orange	Bulat	Rata	Utuh
		3	Putih	Bulat	Rata	Utuh
4	P.Cl	1	Orange	Serupa akar	Mencembung	Berombak
		2	Kuning	Bulat	Rata	Utuh
5	P.Lo	1	Putih	Tak teratur	Melengkung	Berombak
		2	Putih tulang	Tak teratur	Rata	Berombak
		3	Kuning	Bulat	Rata	Utuh
		4	Kuning	Tak teratur	Timbul datar	Berombak
		5	Putih	Titik-titik	Rata	Utuh
		6	Putih	Bulat	Melengkung	Utuh
6	P.S1	1	Kuning	Bulat	Melengkung	Utuh
		2	Putih transparan	Bulat	Rata	Utuh
		3	Putih kekuningan	Tak teratur	Rata	Berombak
		4	Putih kekuningan	Bulat	Melengkung	Utuh

Berdasarkan tabel 2. dapat dilihat bahwa dari inang yang belum teridentifikasi spesiesnya dengan kode P.Si diperoleh 4 bakteri, dari famili plexauridae diperoleh 6 bakteri simbion, dari inang *Sarcophyton* diperoleh 3 bakteri, dari Cladiella diperoleh 2 bakteri simbion, *Lobophytom* diperoleh 6 bakteri simbion, dan dari P S1 diperoleh 4 bakteri simbion. Isolat bakteri tersebut

selanjutnya diuji kemampuannya dalam menghambat bakteri MDR TB.

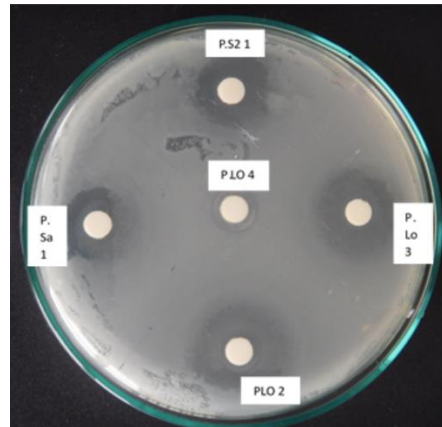
Bakteri MDR TB yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri tuberkulosis yang sudah resisten terhadap antibiotik rifamicin dan SIRE (streptomisin, isoniazid, rifamicin, dan ethambutol). Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode *overlay*, metode tersebut digunakan untuk menguji kemampuan bakteri simbion karang

lunak dalam menghambat pertumbuhan bakteri MDR-TB. Hasil dari uji aktivitas antibakteri tersebut disajikan pada ditunjukkan Tabel 3.

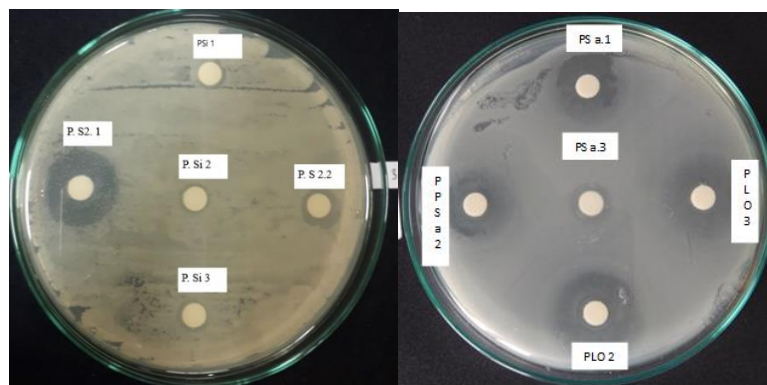
Tabel 3. Uji Aktivitas Antibakteri MDR TB.

No	Kode Bakteri	MDR TB SIRE	MDR TB RIFAMICIN
1.	P. Si 1	-	-
2.	P. Si 2	-	-
3.	P. Si 3	-	-
4.	P. Si 4	-	-
5.	P. S2 1	+	++
6.	P. S2 2	-	+
7.	P. S2 3	-	-
8.	P. S2 4	-	-
9.	P. S2 5	-	-
10.	P. S2 6	-	-
11.	P. Sa 1	+	+
12.	P. Sa 2	-	+
13.	P. Sa 3	-	+
14.	P. Cl 1	-	-
15.	P. Cl 2	-	-
16.	P. Lo 1	-	-
17.	P. Lo 2	+++	+++
18.	P. Lo 3	++	++
19.	P. Lo 4	-	-
20.	P. Lo 5	-	-
21.	P. Lo 6	-	-
22.	P. S1 1	-	-
23.	P. S1 2	-	-
24.	P. S1 3	-	-
25.	P. S1 4	-	-

Keterangan: (+) = Positif menghambat bakteri MDR TB
 (-) = Negatif menghambat bakteri MDR TB



Gambar 1. Simbion Bakteri Karang Lunak yang Menghambat MDR TB SIRE.



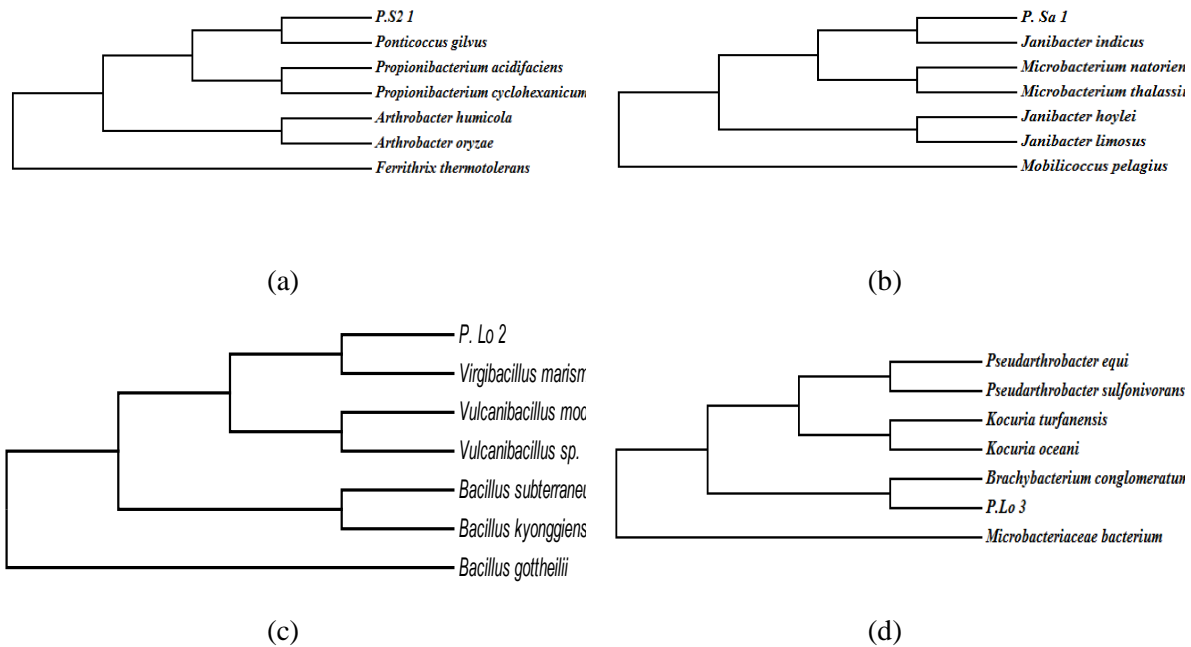
Gambar 2. Simbion Bakteri Karang Lunak yang Menghambat MDR TB Rifampisin.

Dari 25 bakteri ada 4 bakteri yang memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri MDR TB strain SIRE dan Rifamicin. Bakteri tersebut adalah bakteri dengan kode P.S2 1, P. Sa 1, P.Lo 2, dan P.Lo 3. SIRE merupakan obat lini pertama dalam pengobatan penyakit TBC (gambar 1). Bakteri MDR TB strain SIRE adalah bakteri yang sudah resisten terhadap obat SIRE. Bakteri simbion karang lunak P.S2 1, P.Sa 1, P.Lo 2, dan P.Lo 3 dapat menghambat pertumbuhan bakteri MDR TB strain SIRE, sehingga dapat dikatakan bakteri tersebut potensial dalam

menghambat pertumbuhan bakteri MDR TB (gambar 2). Aktivitas antibakteri dari bakteri simbion karang berasal dari senyawa metabolit sekunder yang dihasilkannya. Senyawa metabolit sekunder tersebut dihasilkan ketika sel bakteri menyelesaikan fase logaritmik dan menuju fase stasioner (Sulistiyani dkk, 2015). Bakteri yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri MDR TB dilakukan identifikasi. Hasil identifikasi bakteri ditunjukkan pada tabel 4 dan pohon filogenetik ditunjukkan pada gambar. 3.

Tabel 4. Molekular Identifikasi Bakteri Symbion Karang Lunak.

No	Kode Sampel	Panjang Sekuen (bp)	Nama Hasil BLAST	Accession Number	Homologi (%)
1.	P.S2 1	510	<i>Ponticoccus gilvus</i>	NR_115095	97
2.	P.Sa 1	343	<i>Janibacter indicus</i>	NR_134061	98
3.	P.Lo 2	502	<i>Virgibacillus marismortui</i>	NR_028873	99
4.	P.Lo 3	1325	<i>Brachybacterium conglomeratum</i>	NR_104689	84

**Gambar 3.** Pohon Filogenetik Bakteri (a) P.S2 1; (b) P.Sa 1; (c) P.Lo 2; dan (d) P.Lo3

Hasil identifikasi molekuler menunjukkan bahwa bakteri P. S2 1 identik dengan bakteri *Ponticoccus gilvus* dengan homologi 97%. Bakteri P.Sa 1 identik dengan bakteri *Janibacter indicus* dengan homologi 98%. Bakteri P. Lo 2 identik dengan bakteri *Virgibacillus marismortui* dengan homologi sebesar 99%, dan bakteri P.Lo 3 identik dengan bakteri *Brachybacterium conglomeratum* dengan homologi sebesar 84%. Berdasarkan Hagström *et al.*, (2000) nilai homologi diatas 97% menunjukkan kemiripan tingkat spesies

dan homologi dibawah 97% - 93% menunjukkan kemiripan tingkat genus. Dari keempat bakteri hanya bakteri P Lo 3 yang kurang identik karena kemiripan dibawah 93% yang tidak identik ditingkat spesies maupun genus. Bakteri tersebut kemungkinan bakteri baru yang perlu diidentifikasi lebih lanjut.

4. KESIMPULAN

Ada 4 bakteri (P.S2 1, P.Sa 1, P.Lo 2, dan P.Lo 3) dari 25 bakteri symbion karang lunak yang berasal dari perairan pulau panjang yang memiliki aktivitas terhadap

bakteri MDR-TB. Hasil identifikasi molekuler dilakukan dengan menggunakan PCR 16S DNA, keempat bakteri tersebut memiliki kekerabatan terdekat dengan *Ponticoccus gilvus*, *Janibacter indicus*, *Virgibacillus marismortui* dan *Brachybacterium canglomeratum*

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DIKTI atas dukungan dana yang diberikan melalui skim hibah PEKERTI tahun 2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Buntuan V. 2014. Gambaran Basil Tahan Asam (BTA) Positif pada Penderita Diagnosa Klinis Tuberkulosis Paru di Rumah Sakit Islam Sitti Maryam Manado Periode Januari 2014 s/d Juni 2014. *Jurnal e-Biomedik (eBM)*, 2(2):593-596.
- Hagström, A., J.U.L. Pinhassi and Zweifel. Biogeographical Diversity Among Marine Bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol* 2000; 21 : 231-244.
- Lee, Y. K., J, H, Lee., Dan H, K, Lee. Microbial Symbiosis In Marine Sponges. *The Journal of Microbiology* 2001; 39(4): 254-264
- Radjasa, O.K., A. Sabdono, Junaidi and E. Zocchi. 2007a. Richness of secondary metabolite- producing marine bacteria associated with sponge *Haliclona* sp. *Int. J. Pharmacol.* 3(3):275-279.
- Radjasa, O.K., T. Martens., H-P. Grossart., T. Brinkoff., A. Sabdono., and M. Simon. 2007b. Antagonistic activity of a marine bacterium *Pseudoalteromonasluteoviolacea* TAB4.2 associated with coral *Acropora* sp. *J. Biol. Sci.* 7(2):239-246.
- Sulistiyani, Nugraheni S.A, Radjasa O.K, Sabdono A., Khoeri M.M. 2010. *Antibacterial Activities Of Bacterial Symbionts Of Soft Coral Sinularia Sp.*

Against Tuberculosis Bacteria. *Journal of Coastal Development* 14 (1) : 45-51

- Sulistiyani, Wahjono, H., Radjasa, O. K., Sabdono, A., Khoeri, M. M., Karyana, E. Antimycobacterial Activities from Seagrass *Enhalus* sp. Associated Bacteria Against Multi Drug Resistance Tuberculosis (MDR TB) Bacteria. *Procedia Environmental Sciences* 2015; 23: 253–259. doi: 10.1016/j.proenv.2015.01.038.
- Widyasrini, E. R., Probandari A. N., dan Reviono. 2017. Factors Affecting the Success of Multi Drug Resistance (MDR-TB). *Journal of Epidemiology and Public Health*, 2(1): 45-57.