**KARAKTERISASI BAKTERI SIMBION KARANG LUNAK DARI PULAU PANJANG TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI MDR-TB**

**Yuvianti Dwi Franyoto1, Ahmad Fuad Masduqi1, Dwi Nur Setyasih2, Sakti Muchlisin3, Lia Kusmita1\***

1STIFAR “Yayasan Pharmasi Semarang”

2Bagian Mikrobiologi, Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Tengah

3Tropical Marine Biotechnology, Universitas Diponegoro

\*email: lia\_kusmita@yahoo.com

**ABSTRAK**

*Mycobacterium tuberculosis* telah menginfeksi sepertiga penduduk dunia. Diperkirakan terdapat 8 juta penduduk dunia diserang tuberkulosis dengan kematian 3 juta orang pertahun. .Pengobatan tuberkulosis saat ini ternyata tidak memberikan efektivitas yang tinggi karena munculnya strain MDR Mycobacterium tuberculosis. Oleh karenanya, diperlukan bahan aktif baru guna mengatasi masalah tersebut. Bakteri simbion karang lunak merupakan salah satu sumber yang menjanjikan. 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). 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

**PENDAHULUAN**

Multi drug resistant TB (MDR TB) didefinisikan sebagai 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. Realita tersebut dapat terjadi karena beberapa alasan; pasien mungkin merasa lebih baik dan menghentikan pengobatan, persediaan obat habis atau langka, atau pasien lupa minum obat. Awalnya resistensi ini muncul sebagai akibat dari ketidakpatuhan pengobatan. Selanjutnya transmisi strain MDR TB 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).

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

Senyawa yang bersifat antibiotik tentu bersifat antibakteri, tetapi jika karang lunak diekstrak untuk dijadikan bahan antibakteri secara besar-besaran bertentangan dengan kepentingan konservasi. Biota-biota laut terutama karang lunak hidupnya bersimbiosis dengan beraneka ragam jenis bakteri. Bakteri yang bersimbiosis dengan organisme kemungkinan besar banyak melakukan interaksi biokimia dengan organisme inangnya. Interaksi biokimia tersebut memungkinkan 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)

**METODE**

**Metode Sampling**

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

**Dokumentasi dan Identifikasi**

Dokumentasi terhadap sampel invertebrata dilakukan dengan pengambilan 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.

**Isolasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Karang**

Isolasi bakteri dilakukan dengan metoda sebaran (Radjasa et al, 2007a,b). Sampel invertebrada tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang sebagian berisi 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, kemudian dimasukkan ke dalam labu erlemeyer 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 30oC 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.

**Uji Aktivitas Antibakteri**

Uji aktivitas dari bakteri simbion 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 simbion karang lunak. Inkubasi selama 4 hari di suhu kamar. Aktivitas antibakteri dilihat dari pembentukan zona hambat di sekitar bakteri tuberkolosis (Sulistyani, dkk., 2010)

**Amplifikasi PCR dan sekuensing DNA**

Isolat bakteri dikultur pada 5 ml medium cair ZoBell 2216E pada suhu 20oC selama 24 jam, kemudian dipanen dengan sentrifugasi, 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 60oC selama 20 menit dan 100 oC 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 94oC selama 3 menit, kemudian 30 siklus (*annealing* pada 55oC selama 60 detik, *extension* pada 72oC selama 90 detik dan denaturasi kembali pada 94oC selama 40 detik), serta 42oC selama 1 menit, 72oC selama 5 menit dan terakhir ~4oC. Primer yang digunakan untuk PCR 16S rDNA adalah primer universal 27oF (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 dirunut menggunakan primer 765R dan1114R. Hasil perunutan dianalisis secara otomatis (ABI 3130XL, *Applied Biosystem*).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Sampel atau bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah karang lunak yang berasal dari perairan Pulau Panjang Jepara Jawa Tengah. Barikut 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 *Sinularia* |
| 2. | P.S2 | Pulau Panjang (Family *Plexauridae*) |
| 3. | P.Sa | Pulau Panjang *Sarcophyton* |
| 4. | P.Cl | Pulau Panjang *Cladiella* |
| 5. | P.Lo | Pulau Panjang *Lobophytum* |
| 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 mengahambat 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 menhambat pertumbuhan bakteri MDR-TB. Hasil dari uji aktivitas antibakteri tersebut disajikan pada ditunjukkan 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

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. 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 mengamhambat pertumbuhan bakteri MDR TB. 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 (Sulistyani dkk, 2015). Bakteri yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri MDR TB dilakukan idetifikasi. Hasil identifikasi bakteri ditunjukkan pada tabel 4 dan pohon filogenetik ditunjukkan pada gambar. 1:

**Tabel 4. Molekular idetifikasi bakteri simbion karang lunak**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **No** | **Kode Sampel** | **Panjang Sekuen (bp)** | **Nama Hasil BLAST** | ***Accession Number*** | **Homologi (%)** |
| 1. | P.S2 1 | 510 | *Ponticoccus gilvus* | NR\_115095 | 97 |
| 2. | P.Sa 1 | 343 | *Janibacter indicus* | NR\_134061 | 98 |
| 3. | P.Lo 2 | 502 | *Virgibacillus marismortui* | NR\_028873 | 99 |
| 4. | P.Lo 3 | 1325 | *Brachybacterium canglomeratum* | NR\_104689 | 84 |

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| (a) | (b) |
|  |  |
| (c) | (d) |
| **Gambar 1. Pohon filogenetk 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 canglomeratum* dengan homologi sebesar 84%. Berdasarkan Hagstrӧm *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.

**KESIMPULAN**

Ada 4 bakteri (P.S2 1, P.Sa 1, P.Lo 2, dan P.Lo 3 ) dari 25 bakteri simbion 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*

**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. <https://doi.org/10.26911/jepublichealth.2017.02.01.05>