

## KARAKTERISASI DAN PENAPISAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI ISOLAT BAKTERI SIMBION *Thurudilla lineolata* DAN *Phyllidiella pustulosa*

(*Characterization and Screening Antibacterial Activity of Thurudilla lineolata and  
Phyllidiella pustulosa Symbiont Bacteria Isolate*)

**Kevien Marthin Doringin, Rosita A. J. Lintang<sup>\*</sup>, Deiske A. Sumilat  
Remy E.P. Mangindaan, Losung Fitje**

Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam  
Ratulangi, Manado

\*Email: rositalintang@unsrat.ac.id

### Abstract

Nudibranch are part of a class of Gastropods that do not have a shell and has a bright and striking colour. Nudibranch has different of bacteria and bioactive compounds contained therein to protect themselves from predators. The aim of this study were to isolate symbiotic bacterial derived from *Thurudilla lineolata* and *Phyllidiella pustulosa*, and to observe the antibacterial activity of bacterial isolate against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Isolation and culture of the symbiotic bacterial were made on Nutrient Agar. The antibacterial screening showed that *Thrudilla lineolata* and *Phyllidiella pustulosasymbiotic* bacteria were able to inhibit the growth of against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Nudibranch merupakan bagian dari kelas Gastropoda yang tidak memiliki cangkang dan memiliki warna cerah dan mencolok. Nudibranch memiliki berbagai jenis bakteri dan senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya untuk melindungi diri dari predator. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendapatkan isolat bakteri yang bersimbion dengan *Thrudilla lineolata* dan *Phyllidiella pustulosa*, kemudian mengamati aktivitas antibakteri dari isolat bakteri tersebut terhadap *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*. Isolasi dan kultur bakteri yang bersimbion dengan *Thrudilla lineolata* dan *Phyllidiella pustulosa*, dibuat pada media *Nutrient Agar*. Skrining aktivitas antibakteri menunjukkan isolat bakteri yang bersimbion dengan *Thrudilla lineolata* dan *Phyllidiella pustulosa* mampu menghambat pertumbuhan organisme uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

*Kata kunci:* Nudibranch, *Thrudilla lineolata*, *Phyllidiella pustulosa*, bakteri, isolasi, antibakteri

**PENDAHULUAN**

Nudibranch merupakan bagian dari kelas Gastropoda yang tidak memiliki cangkang dan memiliki warna cerah dan mencolok (Karuso and Scheuer, 2002). Nudibranch memiliki berbagai jenis bakteri dan senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya, dalam hal ini Nudibranch menghasilkan senyawa kimia untuk melindungi dirinya dari predator.

Keberadaan bakteri yang berasosiasi dengan moluska laut memungkinkan penggunaan moluska laut menjadi sumber bakteri yang baru (Pringgenies, 2010). Senyawa bioaktif tersebut diduga memiliki potensi dalam bidang farmasi bahari, namun ketersediaan organisme yang sangat terbatas yang dapat menjadi masalah baru yang akan timbul. Oleh karena itu pemanfaatan mikroorganisme simbiosis menjadi alternatif dalam masalah terbatasnya organisme (Pringgenies, 2009).

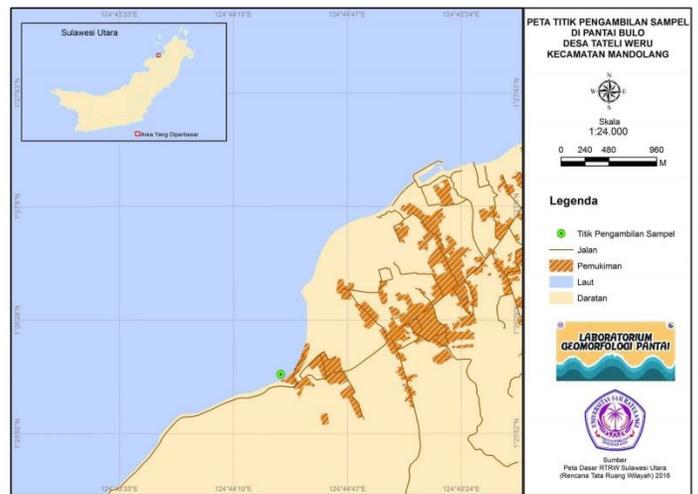
Senyawa bioaktif yang diekstrak secara besar-besaran dari organisme laut akan merusak keberadaan organisme itu sendiri dan bertentangan dengan kepentingan konservasi (Pastra dkk., 2012). Oleh sebab itu, eksplorasi bakteri simbiosis dari Nudibranch perlu dilakukan. Selain itu, berbagai penyakit yang disebabkan oleh bakteri pada saat ini semakin banyak dan diperlukan pencarian senyawa antibakteri baru.

**Tujuan Penelitian:** Tujuan yang hendak dicapai dalam penelitian ini yaitu untuk mendapatkan bakteri simbiosis *Thurudilla lineolata* dan *Phyllidiella pustulosa* dan melakukan skrining aktivitas antibakteri dari isolat bakteri tersebut terhadap *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*.

**METODE PENELITIAN**

**Pengambilan dan Identifikasi Sampel**

Sampel untuk penelitian ini diperoleh dari Perairan Pantai Bulu Desa Tateli Kec. Mandolang Kab. Minahasa, Sulawesi Utara. (Gambar 1)



Gambar 1. Peta Lokasi Penelitian

Penyelaman dilakukan disekitar terumbu karang yang diduga merupakan habitat nudibranch pada kedalaman 3-10 meter menggunakan alat scuba individu nudibranch diambil menggunakan pinset dan langsung dimasukkan kedalam plastic sampel selanjutnya dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasetika Laut Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNSRAT untuk penelitian lebih lanjut. Sampel nudibranch diidentifikasi berdasarkan Gosliner *at.al* (2018) dan WoRMS (*World Register of Marine Species*).

#### **Sterilisasi Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini seperti tabung reaksi, cawan petri, dan beberapa peralatan lainnya disterilkan dalam oven pada suhu 160°C selama  $\pm$  120 menit. Sterilisasi media dilakukan dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

#### **Pembuatan Media NA (*Nutrien Agar*)**

Media NA ditimbang sebanyak 5,6 gram dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditambahkan 200 ml air lau steril 50%. Selanjutnya media disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit dan dalam keadaan hangat dituang ke dalam cawan petri, dibiarkan sampai media mengeras.

#### **Isolasi Sampel dengan Metode Pengenceran**

Sampel yang didapat dipotong-potong lalu dige Sampel Nudibranch dipotong-potong lalu digerus dengan mortar, setelah itu dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi 10 ml air laut steril diaduk perlahan hingga homogen

(konsentrasi  $10^0$ ). Dari konsentrasi ini sampel diencerkan ke dalam 9 ml media baru (konsentrasi  $10^{-1}$ ), dilanjutkan pengenceran tersebut sampai konsentrasi  $10^{-4}$ .

Sampel dari masing-masing konsentrasi dituang kedalam media NA dengan metode sebar (*Spread Plate Method*) dan diinkubasi 1x24 jam untuk melihat pertumbuhan bakteri

#### **Isolasi dan Pemurnian Bakteri Pada Media NA**

Isolasi bakteri pada media padat dilakukan berdasarkan panduan buku "Microbiology Laboratory Manual" (Varghese and Joy, 2014). Koloni sampel hasil dari metode sebar (*Spread Plate Method*) yang masih padat selanjutnya digores kuadran dengan metode *Streak plate method* untuk mendapatkan isolat koloni yang terpisah yang disebut koloni tunggal.

#### **Identifikasi Morfologi Koloni dan Sel Isolat**

Identifikasi morfologi koloni isolat murni dilakukan dengan mengamati bentuk koloni, permukaan koloni, elevasi, tepi koloni, warna koloni, dan pigmentasi. Identifikasi sel secara mikroskopik yaitu mengamati bentuk dan warna sel yang telah dilakukan metode pewarnaan Gram di bawah mikroskop.

#### **Skrining Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Symbion**

Skrining antibakteri dilakukan terhadap isolat murni yang diperoleh untuk mengetahui isolat mana yang memiliki aktivitas antibakteri. Bakteri uji yang digunakan adalah *S. aureus* dan *E. coli* yang telah dicampurkan ke dalam

media NA yang telah disiapkan sebelumnya. Isolat murni ditotolkan pada permukaan media NA yang telah mengandung bakteri uji dan diinkubasi selama 1x24 jam kemudian lakukan pengamatan. Adanya zona hambat (*inhibitory zone/clear zone*) merupakan tanda adanya kepekaan terhadap bakteri uji.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Identifikasi Organisme Nudibranch**

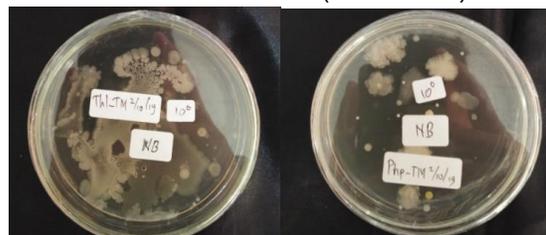
Sampel yang diperoleh dari perairan Pantai Buloh terdapat dua jenis. Jenis pertama dengan ciri-ciri yaitu memiliki ujung berwarna hijau, bagian mantel berwarna hitam dan panjang tubuh 4 cm, teridentifikasi sebagai *Phylidiella pustulosa*. Jenis kedua teridentifikasi sebagai *Thurudilla lineolata* dengan ciri-ciri yaitu tubuh sangat ramping berwarna biru cerah, pola berwarna oranye, terdapat garis melingkar di sepanjang tubuh (Gambar 2).



Gambar 2. Organisme hasil sampling *Phylidiella pustulosa* dan *Thurudilla lineolata*.

**Isolasi dan Pemurnian Bakteri**

Hasil kultur dari metode pengenceran bakteri dari *Phylidiella pustulosa* dan *Thurudilla lineolata* terlihat munculnya gumpalan berwarna putih susu yang menandakan adanya pertumbuhan dari bakteri yang bersimbiosis dengan *Phylidiella pustulosa* dan *Thurudilla lineolata* (Gambar 3).



Gambar 3. Isolasi bakteri *Thurudilla lineolata* dan *Phylidiella pustulos*

Pemurnian dengan gores kuadran menghasilkan koloni tunggal yang selanjutnya diberikan kode pada setiap cawan petri dan dihitung jumlahnya (Tabel 1)

Tabel .1 Jumlah Koloni Tunggal bakteri simbiosis *Thurudilla lineolata* (Thi-TM) dan *Phyllidiella pustulosa*(Php-TM)

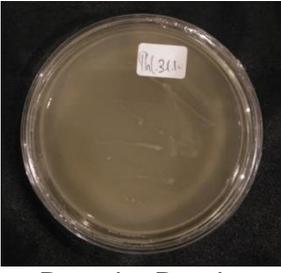
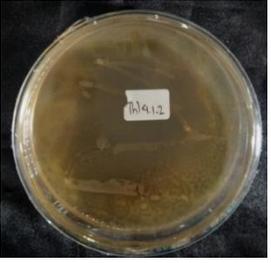
Kode Sampel	Jumlah Koloni Tunggal
Thi-TM.0.1	10
Thi-TM.0.2	7
Thi-TM.0.3	18
Thi-TM.1.1	3
Thi-TM.2.1	8

Thi-TM.2.2	6
Thi-TM.2.3	11
Thi-TM.3.1	7
Thi-TM.4.1	13
Php-TM.0.1	4
Php-TM.0.2	11
Php-TM.3.1	12
Php-TM.3.2	18
TOTAL	128

**Identifikasi Morfologi Koloni Tunggal**

Berdasarkan identifikasi morfologi koloni tunggal didominasi oleh bentuk bulat sebanyak 8 isolat, ketinggian datar 6 isolat, pinggiran bergelombang 4 isolat dan warna koloni putih susu 9 isolat (Gambar 4)

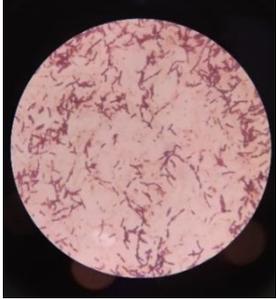
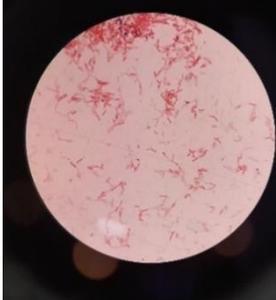
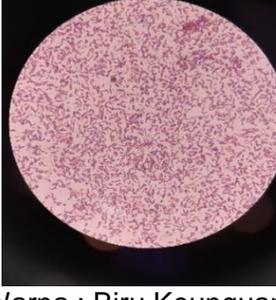
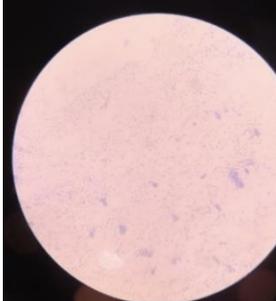
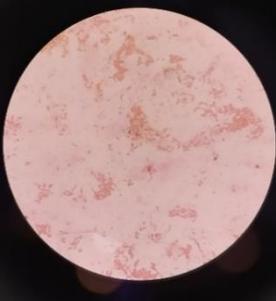
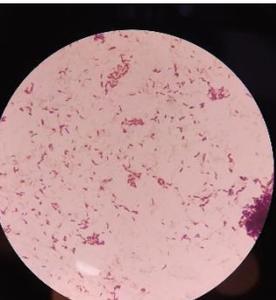
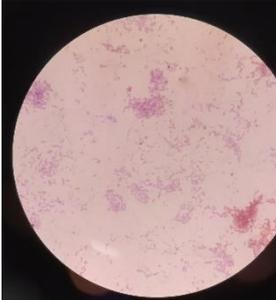
<p>Thi-TM.0.1.1</p>  <p>Bentuk : Bundar Ketinggian : Menonjol Pinggiran : Rata Warna koloni : Putih susu</p>	<p>Thi-TM. 1.1.1</p>  <p>Bentuk : Tidak beraturan Ketinggian : Cembung Pinggiran : Berlekuk Warna koloni : Putih susu</p>	<p>Thi-TM 0.3.3</p>  <p>Bentuk : Tidak beraturan Ketinggian : Cekung Pinggiran : Bergelombang Warna koloni : Putih susu</p>
<p>Thi-TM 2.1.2</p>  <p>Bentuk : Tidak beraturan Ketinggian : Menonjol Pinggiran : Bergelombang Warna koloni : Putih susu</p>	<p>Thi-TM 2.2.3</p>  <p>Bentuk : Bundar Ketinggian : Datar Pinggiran : Bergelombang Warna koloni : Kuning lemon</p>	<p>Thi-TM 2.3.1</p>  <p>Bentuk : Bundar Ketinggian : Menonjol Pinggiran : Entire Warna koloni : Kuning lemon</p>

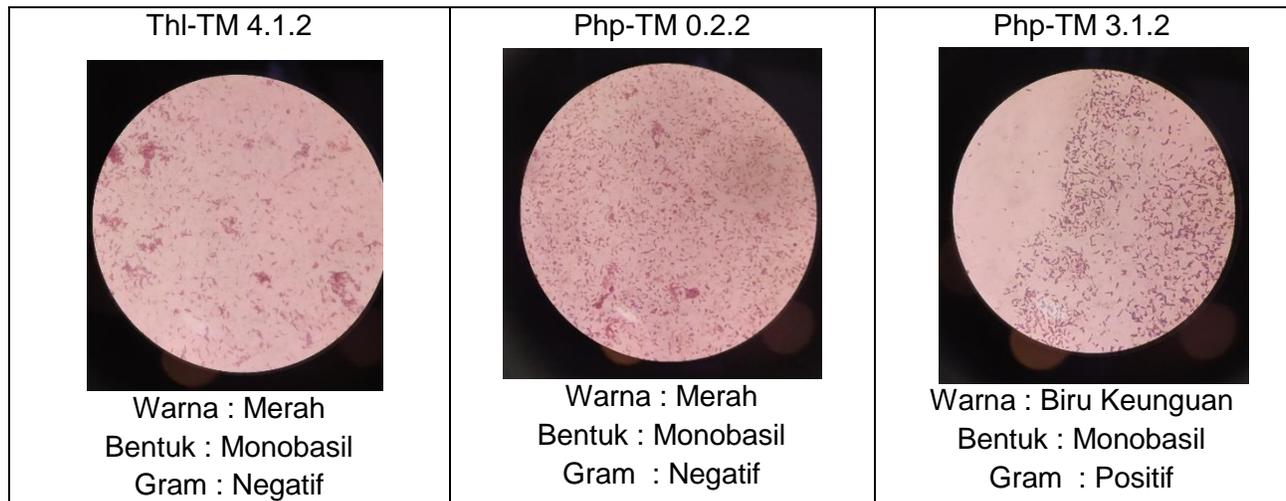
<p>ThI-TM 2.3.4</p>  <p>Bentuk : Bundar Ketinggian : Cekung Pinggiran : Bergelombang Warna koloni : Putih susu</p>	<p>ThI-TM 3.1.1</p>  <p>Bentuk : Bundar Ketinggian : Datar Pinggiran : Rata Warna koloni : Putih susu</p>	<p>ThI-TM 3.1.2</p>  <p>Bentuk : Tidak beraturan Ketinggian : Datar Pinggiran : Berlekuk Warna koloni : Putih susu</p>
<p>ThI-TM 4.1.2</p>  <p>Bentuk : Bundar Ketinggian : Datar Pinggiran : Rata Warna koloni : Kuning lemon</p>	<p>Php-TM 0.2.2</p>  <p>Bentuk : Bundar Ketinggian : Datar Pinggiran : Bergelombang Warna koloni : Putih susu</p>	<p>Php-TM 3.1.2</p>  <p>Bentuk : Bundar Ketinggian : Datar Pinggiran : Berlekuk Warna koloni : Putih susu</p>

Gambar 4. Karakterisasi koloni tunggal bakteri simbiosis *Thrudilla lineolata* dan *Phylidiella pustulosa.pustulosa*

#### Identifikasi Morfologi Sel Isolat Bakteri

Berdasarkan identifikasi secara mikroskopik didapatkan 5 isolat yang Gram positif yaitu isolat ThI-TM 3.3.1, ThI-TM 2.1.2, Php-TM 3.1.2, ThI-TM 3.1.2, ThI-TM 0.3.3 dan 7 isolat bakteri gram negatif yaitu isolate ThI-TM 1.1.1, ThI-TM 2.3.1, ThI-TM 0.1.1, Php-TM 0.2.2, ThI-TM 2.2.3, ThI-TM 4.1.2, ThI-TM 2.3.4 (Gambar 5)

<p>ThI-TM. 0.1.1</p>  <p>Warna : Merah Bentuk : Streptobasil Gram : Negatif</p>	<p>ThI-TM. 1.1.1</p>  <p>Warna : Merah Bentuk : Streptobasil Gram : Negatif</p>	<p>ThI-TM 0.3.3</p>  <p>Warna : Biru Keunguan Bentuk : Monobasil Gram : Positif</p>
<p>ThI-TM 2.1.2</p>  <p>Warna : Biru Keunguan Bentuk : Streptokokus Gram : Positif</p>	<p>ThI-TM 2.2.3</p>  <p>Warna : Merah Bentuk : Monobasil Gram : Negatif</p>	<p>ThI-TM 2.3.1</p>  <p>Warna : Merah Bentuk : Streptokokus Gram : Negatif</p>
<p>ThI-TM 2.3.4</p>  <p>Warna : Merah Bentuk : Monobasil Gram : Negatif</p>	<p>ThI-TM 3.1.1</p>  <p>Warna : Biru Bentuk : Monobasil Gram : Positif</p>	<p>ThI-TM 3.1.2</p>  <p>Warna : Biru Keunguan Bentuk : Monobasil Gram : Positif</p>



Gambar 5. Hasil Pewarnaan Gram Sel Isolat Murni Bakteri Simbion *Thrudilla lineolata* Dan *Phyllidiella pustulosa*

#### **Skrining Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Simbion *Thrudilla lineolata* dan *Phyllidiella pustulosa***

Skrining aktivitas antibakteri bertujuan untuk melihat isolat yang berpotensi dalam menghasilkan senyawa-senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Isolat bakteri dari masing-masing spesies memiliki potensi antibakteri yaitu 5 isolat bakteri dari spesies *Thrudilla lineolata* dan 1 isolat bakteri dari spesies *Phyllidiella pustulosa* (Tabel 2)

Hasil pengamatan 1x24 pada isolat 1/ Thl-TM 0.3., isolat 2/Thl-TM 2.2.3, isolat 3/ Thl-TM 2.3.1 dan isolat 6/Php-TM 0.2.2 memperlihatkan adanya aktivitas penghambatan terhadap bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli*. Sementara pada isolat 4/ Thl-TM 4.1.2 dan isolat 5/ Thl-TM 2.1.2 menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap bakteri *E.coli*.

Terbentuknya zona hambat di sekitar isolat bakteri simbion *Phyllidiella pustulosa* dan *Thrudilla lineolata* menunjukkan bukti bahwa isolat-isolat bakteri simbion tersebut memiliki potensi menghasilkan senyawa antibakteri dengan menghambat pertumbuhan bakteri uji.

Penelitian yang dilakukan oleh Bohringer *et al.* (2017), Kristiana *dkk* (2019), Arie *dkk* (2020), Dajoh *dkk* (2020), Ukar *dkk* (2020) juga membuktikan bahwa bakteri terkait Nudibranch di Indonesia aktif dalam produksi senyawa antibakteri.

Tabel 2. Hasil skrining aktivitas antibakteri dari isolat murni bakteri simbion *Phylidiella pustulosa* dan *Thurudilla lineolata pustulosa*.

No	Kode/ isolate	Bakteri Uji	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	Thi-TM 0.3.3	+	+
2	Thi-TM 2.2.3	+	+
3	Thi-TM 2.3.1	+	+
4	Thi-TM 4.1.2	-	+
5	Thi-TM 2.1.2	-	+
6	Php-TM 0.2.2	+	+

Metabolit sekunder yang dihasilkan dari *Phylidiella pustulosa* dan *Thurudilla lineolata* diduga merupakan bentuk adaptasi organisme terhadap lingkungannya. Menurut Rinehart (1992) dalam Opa, *dkk* (2018), apabila tekanan lingkungannya relatif tinggi maka senyawa yang dihasilkan akan banyak. Organisme laut, khususnya yang hidup di daerah tropis untuk kelangsungan hidupnya menghadapi berbagai tantangan, harus berkompetisi untuk mendapatkan ruang tumbuh, sinar matahari dan makanan. Metabolit sekunder yang dihasilkan mungkin bisa diproduksi sendiri oleh organisme dan bisa diproduksi dari sumber makanan.

Senyawa antibakteri dapat digolongkan juga sebagai spektrum luas dan spektrum sempit. Spektrum luas artinya senyawa tersebut bekerja aktif terhadap banyak jenis bakteri baik bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Sedangkan spektrum sempit artinya suatu

senyawa bekerja aktif hanya terhadap satu golongan bakteri saja baik hanya pada bakteri gram positif ataupun hanya pada bakteri gram negatif (WHO, 2014). Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa antibakteri *Phylidiella pustulosa* dan *Thurudilla lineolata* termasuk berspektrum luas karena kemampuannya menghambat bakteri Gram positif dan Gram negatif.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari *Phylidiella pustulosa* dan *Thurudilla lineolata* sebanyak 128 koloni, terdiri dari 45 koloni tunggal dari *Phylidiella pustulosa* dan 83 koloni tunggal dari *Thurudilla lineolata*.

2. Penapisan aktivitas antibakteri isolat murni memperlihatkan 6 isolat yang memiliki kemampuan penghambatan terhadap bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli*.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Arie, A. K., R. A. J. Lintang, R. E. P. Mangindaan, A. B. Windarto, F. Losung, S. N. J. Longdong. 2020. Isolasi dan Skrining Aktivitas Antibakteri dan Bakteri Simbion Nudibranch *Phyllidiella pustulosa* dan *Thuridilla lineolata*. Jurnal Pesisir dan Laut Tropis. 8 (2) : 40-47.
- Böhringer N, Fisch KM, Schillo D, Bara R, Hertz C, Grein F, Eisenbarth JH, Kaligis F, Schneider T, Wägele H, König GM, Schäberle TF. 2017. Antimicrobial Potential of Bacteria Associated with Marine Sea Slugs from North Sulawesi, Indonesia. Front Microbiol 8: 1092. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01092.
- Dajoh, T. A. U., R. A. Bara, E. Angkouw, M. Ompi, R. A. J. Lintang, C. Lumenta. 2020. Uji Aktivitas Antibakteri dan Anti-UV *Phyllidiella nigra* dan Bakteri Simbiotiknya Dari Perairan Tanjung Mandolang. Jurnal Pesisir dan Laut Tropis. 8 (2) : 61-71.
- Gosliner, T. M., Valdes, A., Behrens, D. W. 2018. Nudibranch & Sea Slug Identification – Indo-Pacific – 2 nd Edition
- Kristiana, R., Sibero, M. T., Farisa, M. Y., Ayuningrum, D., Dirgantara, D., Hanafi, M., Radjasa, O. K., Sabdon, A., Trianto, A. 2019. Antibacterial potential of nudibranch-associated bacteria from Saparua and Nusa Laut Islands, Indonesia. Biodiversitas Vol. 20, No. 7, 1811-1819.
- Opa, S. L., Bara, R. A., Gerung G. S., Rompas, R. M. Lintang, R. A. J., Sumilat, D. A. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi N-Heksana, Metanol Dan Air Dari Ascidian *Lissoclinum* sp. Jurnal Pesisir dan Laut Tropis. Vol. 1. No. 1. Hal. 69-80.
- Pastra, D. A., Melki dan Surbaktii A. 2012. Penapisan Bakteri yang Bersimbiosis dengan Spons Jenis *Aplysina* sp. Sebagai Penghasil Antibakteri dari Perairan Pulau Tegal Lampung. Jurnal Maspari 4 (1): 77-82.
- Pringgencies D. 2009. Bioprospeksi Bakteri Simbion Dari Gastropoda *Conus miles* terhadap Strain Bakteri MDR (Multi Drug Resistant). Ilmu Kelautan. 14 (1): 42-49.
- Pringgencies D. 2010. Karakteristik Senyawa Bioaktif Bakteri Simbion Moluska dengan GC-MS. J. Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis. 2 (2) : 34-40.
- Ukar, M. A., R. A. Bara, V. Warouw, I. F. M. Rumengan, F. Losung, M. Salaki. 2020. Aktivitas Senyawa Antibakteri dan Anti-UV Dari *Phyllidia varicose* (Cuvier, 1804) dan Bakteri Simbionnya (Nudibranch Gastropoda) Dari Perairan Tanjung Mandolang, Minahasa. Jurnal Pesisir dan Laut Tropis. 8 (2) : 27-39.

- Varghese, N. P. P. Joy. 2014. *Microbiology Laboratory Manual Book*. Kerala Agricultural University. India. Hal. 18-33.
- WHO. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. World Health Organization. Hal. 257.
- World Register of Marine Species (WoRMS). <http://www.marinespecies.org/> (Diakses pada 02 Agustus 2020, pukul 17.30 WITA)