

Full Paper

PENELUSURAN SENYAWA BIOAKTIF BAKTERI YANG BERASOSIASI DENGAN ANEMON LAUT SERTA IDENTIFIKASI MOLEKULERNYA BERBASIS 16S rDNA

INVESTIGATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS OF SEA ANEMONE-ASSOCIATED BACTERIA AND THEIR MOLECULAR IDENTIFICATION BASED ON 16S rDNA

**Naely K. Wusqy^{1*}, Dwi I. Prayitno¹, Ocky K. Radjasa², Leenawaty Limantara^{1,3}
dan Ferry F. Karwur¹**

¹Universitas Kristen Satya Wacana

Jl. Diponegoro No. 52-60 Salatiga, Jawa Tengah 50711

²Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro

Jl. Prof. H. Soedarto, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50239

³Ma Chung Research Center for Photosynthetic Pigments Universitas Ma Chung

Villa Puncak Tidar N-01, Malang 65151

*Penulis untuk korespondensi, E-mail: naely_wusqy@yahoo.com

Abstrak

Mikroorganisme yang berasosiasi dengan anemon laut merupakan salah satu sumber yang kaya akan produk senyawa bioaktif. Dalam penelitian ini dua jenis anemon laut *Entacmaea medusivora*, telah diisolasi dari Maratua, Kalimantan Timur dan Anemon hijau yang diisolasi dari Bandengan, Jepara. Sembilan isolat bakteri telah berhasil diisolasi dari *E. medusivora* dan diuji aktivitasnya terhadap 8 strain bakteri patogen. Dari hasil skrining, satu dari sembilan bakteri tersebut mampu menghambat strain *V. parahaemolyticus*. Isolat aktif ini juga terdeteksi mampu mengamplifikasi keberadaan gen *Polyketide synthase* (PKS). Identifikasi molekuler berhasil mengidentifikasi isolat tersebut sebagai *Bacillus cereus*. Sedangkan satu isolat bakteri yang diisolasi dari Anemon hijau diduga mampu memproduksi pigmen dan mampu mensintesis karotenoid. Dari hasil analisa dengan spektrofotometer ultra-violet tampak pada panjang gelombang 300-800 nm dengan pelarut aseton, pola spektra yang muncul menunjukkan pola spektra karotenoid yang mempunyai puncak serapan pada panjang gelombang 300-500 nm (pada daerah cahaya tampak). Dari hasil identifikasi molekuler dengan metode 16s RDNA, bakteri tersebut memiliki kekerabatan dengan *Xanthomonas* sp.

Kata kunci : anemon laut, bakteri, gen PKS-NRPS, karotenoid

Abstract

Sea anemone-associated microorganisms are among of the most interesting and promising marine natural product sources, which produce various biological activities. In this study, marine bacteria were isolated from 2 kinds of sea anemones, *Entacmaea medusivora* and Green Anemone that were collected from Bandengan, Jepara and Maratua, East Borneo respectively. Nine bacterial isolates of *E. medusivora* were screened for antibacterial activity against 8 strains. One out of 9 bacterial isolates was successfully screened and was found to be active against *V. parahaemolyticus* strains. This active isolate was also capable of amplifying PKS gene fragments necessary for the biosynthesis of polyketide synthase. The identification results revealed that the active isolate is *Bacillus cereus*. One bacterial isolate of Green Anemone was screened to produce the pigment and positively synthesize carotenoids. Initial analysis with atomic absorption spectrophotometric method revealed that the wave length of bacterial pigment were in the range of 300-600 nm, which are categorized that within the group of carotenoid pigments. From the results of molecular identification by 16S rDNA method, it was shown that bacterium was closely related to *Xanthomonas* sp.

Key words: bacteria, carotenoid, PKS-NRPS genes, sea anemone

Pengantar

Anemon laut merupakan salah satu biota yang cukup potensial dalam ekosistem karang. Kandungan senyawa

metabolit sekunder darimikroorganisme laut tersebut diketahui merupakan sumber yang kaya akan produk senyawa bioaktif dan mempunyai potensi aplikasi

kesehatan dan bioteknologi (Thiel & Imhoff, 2003). Tentakel anemon laut digunakan sebagai penangkap makanan (Friese, 1993). Pada tentakel anemon laut mengandung sel-sel penyengat yang disebut *nematocyst* yaitu racun yang mengandung berbagai zat seperti peptida, protein, fosfolipid, fosfolipase, glikoprotein, sterols, bioaktif amina, dan karbohidrat. Masing-masing *nematocyst* terdiri dari gelembung kecil yang berisi *actinoporins*, sebuah filamen dalam dan sebuah sensor luar yang kecil (Shiomi *et al.*, 2003). Terdapatnya asosiasi mikroorganisme dengan organisme laut yang juga mensintesis metabolit sekunder seperti organisme inangnya merupakan potensi besar sumber alternatif eksplorasi baru (Proksch *et al.*, 2002; Burgess *et al.*, 1999).

Isolasi dan identifikasi bakteri yang berasosiasi dengan anemon laut yang mampu menghasilkan senyawa bioaktif tidak hanya memberikan informasi mengenai keragaman bakteri dalam struktur komunitas mikroba, akan tetapi juga dapat memberikan suatu tahapan dari solusi masalah penyediaan senyawa-senyawa bioaktif (Proksch *et al.*, 2002). Dalam penelitian ini telah dilakukan isolasi dan identifikasi secara molekuler terhadap bakteri penghasil senyawa bioaktif diantaranya senyawa anti bakteri dan biopigmen yang berasosiasi dengan anemon laut.

Bahan dan Metode

Sampling Anemon Laut

Bakteri diisolasi dari anemon hijau yang diambil dari perairan Bandengan, Jepara, Jawa Tengah

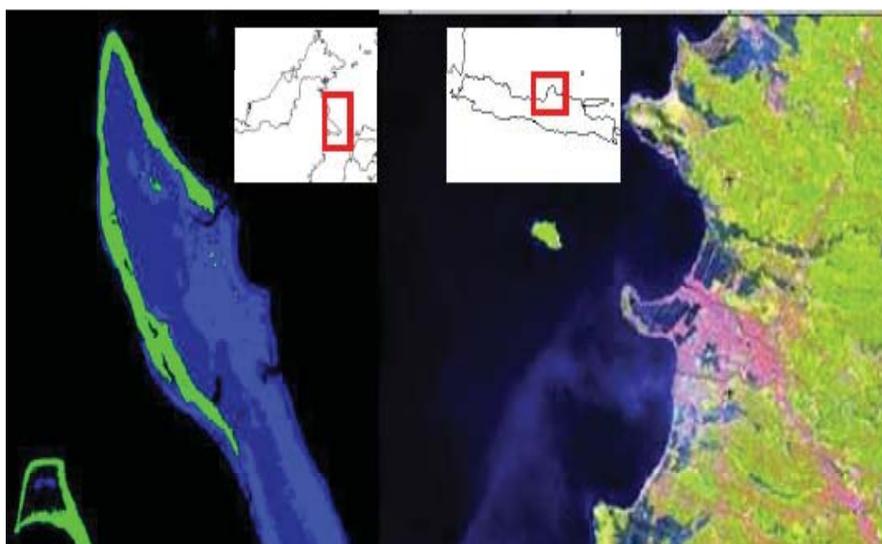
dan anemon *E. medusivora* yang diambil dari Danau Hajibuang, Pulau Maratua Kabupaten Berau Kalimantan Timur.

Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri dilakukan dengan pemotongan bagian tubuh anemon, kemudian diencerkan dan ditanam pada media agar Zobell 2216E dan media soybean manitol dalam cawan petri. Sebanyak 1 L media ZoBell 2216E dibuat dengan mencampur 15 g bacto-agar (Merck); 2,5 g bacto-pepton (Merck); 0,5 g ekstrak yeast (Merck). Media soybean manitol dibuat dengan mencampur 20 g soy bean, 20 g manitol (Manitol) dan 15 g agar (Merck). Inkubasi dilakukan pada suhu kamar selama 48 jam (Radjasa *et al.*, 2007). Berdasarkan morfologi warna dari koloni-koloni bakteri yang tumbuh, dilakukan pemurnian dengan teknik goresan (*streak method*) pada cawan petri (Madigan *et al.*, 2000).

Uji Aktivitas Anti Bakteri Patogen

Metode yang digunakan adalah metode *overlay* (Terkina *et al.*, 2006) dengan menyiapkan cawan petri steril berisi 20 ml media. Bakteri ditanam pada media soybean manitol dan diinkubasi selama 4 hari. Pada hari ketiga, bakteri uji ditanam pada media zobel cair dan digojog dengan shaker selama 1 hari. Pada hari keempat, bakteri uji yang telah dishaker dipindahkan ke dalam media *soft agar* dengan perbandingan volume bakteri uji 1% dari volume media *soft agar*. Bakteri uji tersebut dituangkan di atas bakteri sampel yang telah ditanam, dan diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan melihat ada tidaknya zona hambatan pertumbuhan bakteri di sekeliling sampel.



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel A: Danau Hajibuang, Pulau Maratua Kabupaten Berau Kalimantan Timur. B: Bandengan, Jepara, Jawa Tengah (Citra Landsat TM 2000).

Seleksi Bakteri dengan Ekstraksi

Untuk ekstraksi dan identifikasi pigmen digunakan aseton, dietil eter, metanol, asetonitril, *n*-heksana, plat KLT silika gel 60 F₂₅₄ (Merck), silika gel Si-60, gas N₂, akuades, dan akuabides Bakterianemon hijau yang berwarna diekstraksi pigmennya menggunakan pelarut aseton-metanol dingin (7:2 v/v) (Kuki *et al.*, 1994) dandisonikasi (Britton, 1995). Seleksi bakteri dilakukan dengan mengamati spektrum ekstrak kasar yang dilarutkan dalam aseton menggunakan spektrofotometer ultraviolet-tampak berkas rangkap Varian Cary 50 pada panjang gelombang 300–800 nm.

Karakterisasi Biopigmen

Untuk proses karakterisasi biopigmen, ekstrak kasar dianalisis dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) menggunakan fase diam ODS RP-C₁₈ dan fase gerak metanol:asetonitril (7:3 v/v), dengan kecepatan alir 1 ml.menit⁻¹ (Maeda, 2005). Analisis dilakukan pada panjang gelombang 300 - 800 nm.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode *freeze and thaw* (Radjasa *et al.*, 2007), dengan memasukkan 1 (satu) ose kultur bakteri dalam 100 µL akuabides steril. Selanjutnya suspensi dimasukkan dalam pendingin pada suhu -70°C dan dipanaskan dalam air bersuhu 95°C selama 10 menit. Langkah tersebut diulangi sebanyak 5 kali.

PCR – PKS dan NRPS

Pada PCR PKS ini digunakan primer KSDPQQF (5' MGN GAR GCN NWN SMNATG GAY CCN CAR CAN MG 3') dan KSHGTGR (5' GGR TCN CCN ARN SWN GTN CCN GTN CCR TG 3') (Piel, 2002). Pada PCR NRPS ini digunakan primer A2gamF (5' AAG GCN GGC GSB GCS TAY STG CC 3') dan A3gamR (5' TTG GGB IKB CCG GTS GIN CCS GAG GTG 3') (mwig-Biotech, Ebersberg, 34 Germany *dalam* Radjasa *et al.*, 2007). Amplifikasi DNA dilakukan dengan siklus denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit, kemudian berturut-turut denaturasi (94°C selama 1 menit), *annealing* (55 °C selama 1 menit), dan *extension* (72°C selama 2 menit). Rangkaian denaturasi, *annealing* dan *extension* diulang hingga 45 siklus (Radjasa, 2005).

Reaksi Berantai Polimerase (PCR) 16S rDNA

Amplifikasi PCR 16s rDNA dilakukan dengan perlakuan suhu: 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 & Kamei, 2003).

Visualisasi, Purifikasi Produk PCR 16s rDNA dan Perunutan DNA

Visualisasi produk PCR 16S rDNA dilakukan melalui elektroforesis dengan cara memasukkan 5 µL produk PCR ke dalam sumur gel agarosa 1%. Sedangkan untuk visualisasi produk PCR PKS-NRPS dilakukan pada gel agarosa 2%. Purifikasi dilakukan untuk mendapatkan DNA murni hasil amplifikasi PCR 16S rDNA. Bahan yang digunakan yaitu *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Germany) yang terdiri dari tiga larutan yaitu, larutan 1 (*binding buffer*), larutan 2 (*washing buffer*) dan larutan 3 (*elution buffer*). DNA hasil PCR dirunut melalui reaksi ekstensi menggunakan primer 1492R dan *Big Dye terminator* V.3.1. Hasil reaksi tersebut dibaca dengan (ABI 3130XL, *Applied Biosystem*).

Hasil dan Pembahasan

Dari *E. medusivora* dan Anemon Hijau (Gambar 2) diperoleh 10 isolat bakteri. Sembilan isolat berhasil diisolasi dari *E. medusivora* dan 1 isolat dari Anemon Hijau. Penampakan bakteri yang berhasil diisolasi dapat dilihat pada Gambar 3.

Uji Sensitivitas Antibakteri

Sembilan isolat bakteri simbiosis *E. Medusivora* yang telah diuji terhadap beberapa bakteri uji, diperoleh 1 bakteri yang mempunyai aktivitas antibakteri (Gambar 4). Spesifikasi aktivitas antibakteri tersebut ditunjukkan pada Tabel 1.

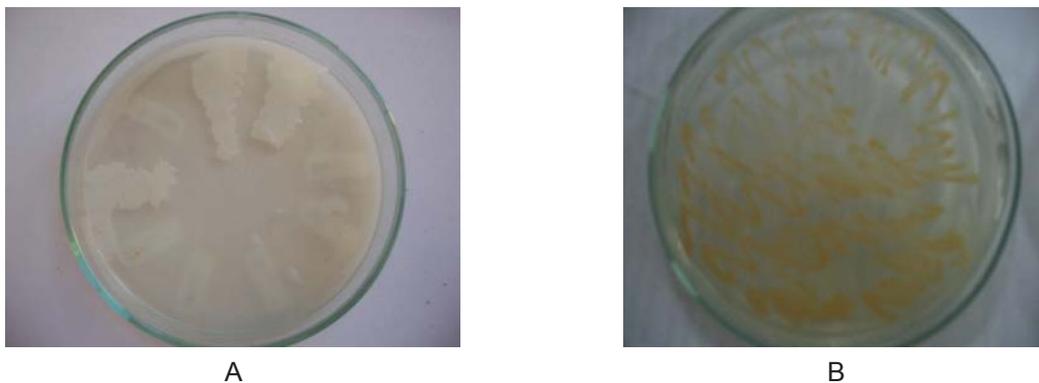
Polymerase Chain Reaction - Polyketide Synthase - Non Ribosomal Peptide Synthetase

Hasil elektroforesis menunjukkan adanya berkas DNA sekuen PKS pada bakteri *E. medusivora* dibandingkan dengan bakteri kontrol *Bacillus subtilis* 168 (K). Berkas DNA mempunyai panjang sekitar 300 bp, sesuai dengan panjang sekuen PKS dan NRPS yaitu 279 pasang basa (Piel, 2002).

Dari sembilan bakteri anemon laut *E. Medusivora* yang telah berhasil diskroning, terdapat satu bakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji *Vibrio parahaemolyticus*. Bakteri ini merupakan bakteri penyebab wabah penyakit pada udang dan kerapu tikus (Istiqomah *et al.*, 2004). Jika V.



Gambar 2. A: Anemon *E. Medusivora*. B: Anemon hijau yang berwarna kuning.



Gambar 3. A: Penampakan isolat bakteri *E. medusivora* yang berhasil dikultur dengan media soybean manitol. B: Penampakan isolat bakteri anemon hijau yang mengandung pigmen, dikultur dengan media *Zobell 2216E*.

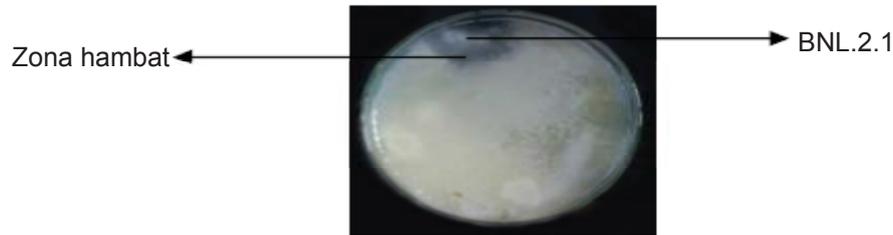
Tabel 1. Uji kualitatif isolat bakteri anemon laut *E. medusivora* dengan beberapa bakteri uji.

Isolat	<i>Enterobacter</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>V.harvey</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>Pseudomonas</i>
BAC 1.1	-	-	-	-	-	-	-	-
BAC 1.2	-	-	-	-	-	-	-	-
BAC 2.1	-	-	-	-	-	-	-	-
BAC 2.2	-	-	-	-	-	-	-	-
BAC 2.3	-	-	-	-	-	-	-	-
BNL 2.1	-	-	-	-	-	+	-	-
						(18,05 ± 0,004)		
BNL 2.2	-	-	-	-	-	-	-	-
BNL 2.3	-	-	-	-	-	-	-	-
BNL 2.4	-	-	-	-	-	-	-	-

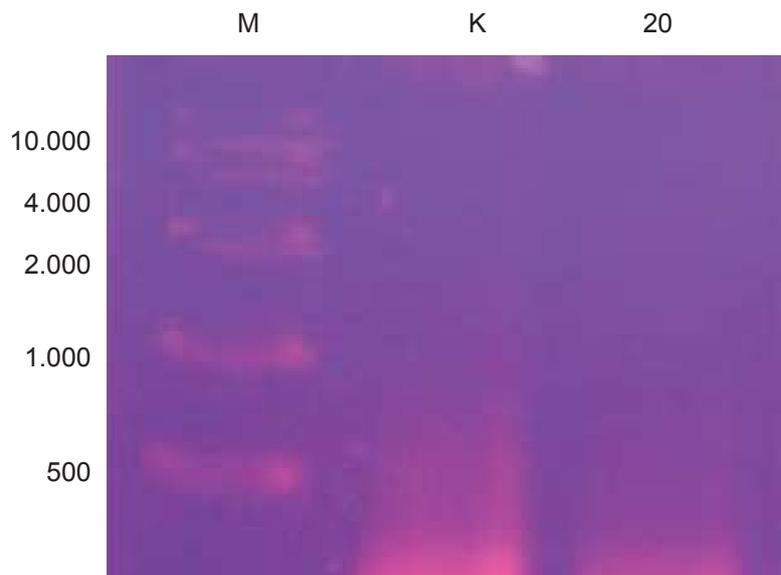
parahaemolyticus masuk ke dalam tubuh manusia dapat menyebabkan penyakit muntah berak bahkan hingga diare akut (Zein, 2004).

Burgess *et al.*, (1999) menyatakan bahwa apabila dua spesies yang bersaing ditumbuhkan pada tempat yang sama, maka akan ada kompetisi diantara mikroba tersebut untuk mencari ruang dan nutrisi, sehingga akan menimbulkan berbagai strategi untuk tumbuh. Menurut Manitto (1981) hal ini terkait dengan

mekanisme pertahanan diri bakteri. Substansi kimia sering berperan dalam kelangsungan suatu spesies dalam menghadapi spesies yang lain. Spesies yang satu akan menghasilkan suatu senyawa yang dapat meracuni spesies yang lain, sehingga pertumbuhan spesies tersebut akan terganggu. Interaksi kimia antara spesies bakteri yang berbeda akan mempengaruhi produksi dan sekresi metabolit sekunder antimikroba (Burgess *et al.*, 1999).



Gambar 4. Uji sensitivitas isolat bakteri anemon laut terhadap *V. parahaemolyticus*. BNL.2.1 menunjukkan isolat bakteri yang mempunyai aktivitas ditandai dengan adanya zona hambat disekelilingnya.



Gambar 5. Elektroforesis PCR PKS. Berkas DNA bernomor 20: isolat BNL 2.1 yang diisolasi dari *E. medusivora*, K: Kontrol (*Bacillus subtilis* 168) dengan panjang basa 279 bp, M: Marker.

Tidak adanya aktivitas anti bakteri selain BNL 2.1 diduga dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya bakteri anemon laut selain BNL 2.1 tersebut tidak dapat menghasilkan senyawa antibiotik. Menurut Bunch & Harris (1986), untuk memproduksi antibiotik diperlukan gen struktural yang memberikan kode untuk enzim yang terlibat dalam biosintesis metabolit sekunder dan gen regulatori yang menentukan aktif tidaknya represi atau induksi dari gen struktural untuk biosintesis. Apabila tidak mempunyai gen tersebut, bakteri tidak akan bisa menghasilkan senyawa antibiotik.

Mikroorganisme mampu menghasilkan metabolisme sekunder di dalam gennya untuk pertahanan diri dan perlawanan. *Polyketide synthase* (PKS) dan *Non Ribosomal Peptide Synthetase* (NRPS) dikenal sebagai bagian dari jenis metabolit sekunder yang dihasilkan mikroorganisme, termasuk di dalamnya

adalah agen anti tumor dan antibiotik yang sangat bernilai secara medis. Untuk mengetahui jenis metabolit sekunder yang dihasilkan, dapat dilakukan dengan mendeteksi keberadaan fragmen gen yang mempengaruhi produksi metabolit sekunder isolat bakteri terpilih. Fragmen gen ini termasuk gen struktural, yaitu gen yang memberikan kode untuk enzim yang terlibat dalam biosintesis metabolit sekunder.

Hasil analisis deteksi keberadaan gen PKS dan NRPS menunjukkan bahwa bakteri terpilih tersebut memiliki gen penyandi PKS dan tidak memiliki gen penyandi NRPS. Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa metabolit sekunder yang dihasilkan diduga merupakan bahan bioaktif enzim PKS.

Polyketide tersebut merupakan senyawa bioaktif yang disintesa oleh enzim multifungsional (Otsuka *et al.*, 2004). Beberapa *polyketide* dapat diperoleh

dari senyawa jenis *macrolide* dan *polyaromatic* yang diproduksi oleh bakteri. *Polyketide* disintesis dari katalis reaksi sequen oleh aktivitas enzim yang disebut *polyketide synthases* (PKSs). PKS merupakan multienzime protein kompleks yang terdiri dari sebuah kelompok koordinat sel yang aktif. Biosintesis terjadi dengan cara rantai karbon sederhana 2-, 3-, 4-, seperti asetil-CoA, propionil CoA, butiril-CoA dan derivat-derivatnya malonil-, methilmalonil- dan ethilmalonil-CoA. PKS terdiri dari serangkaian modul yang merupakan situs aktif untuk mengkatalisis tiap siklus kondensasi dan pemanjangan rantai. Tiap modul pada PKS terdiri dari domain inti untuk penambahan tiap unit peptida atau ketida dan sejumlah domain optional yang bertanggungjawab untuk modifikasi gugus ketida (Ansari, 1992). Salah satu contoh produk yang mengandung senyawa *polyketide* adalah *erythromycin* yang digunakan sebagai bahan antibiotik, obat untuk infeksi saluran nafas, gonorhea dan sifilis.

Seleksi Bakteri Simbion Anemon Hijau dengan Ekstraksi

Dari beberapa isolat bakteri simbion Anemon hijau, diperoleh 1 isolat berwarna kuning. Morfologi bakteri yang berwarna kuning tersebut mengindikasikan bahwa bakteri memiliki potensi sebagai sumber pigmen. Untuk memperkuat pernyataan tersebut, dilakukan isolasi pigmen menggunakan metode ekstraksi pelarut. Pada proses ini juga dilakukan sonikasi untuk memecah membran sel bakteri.

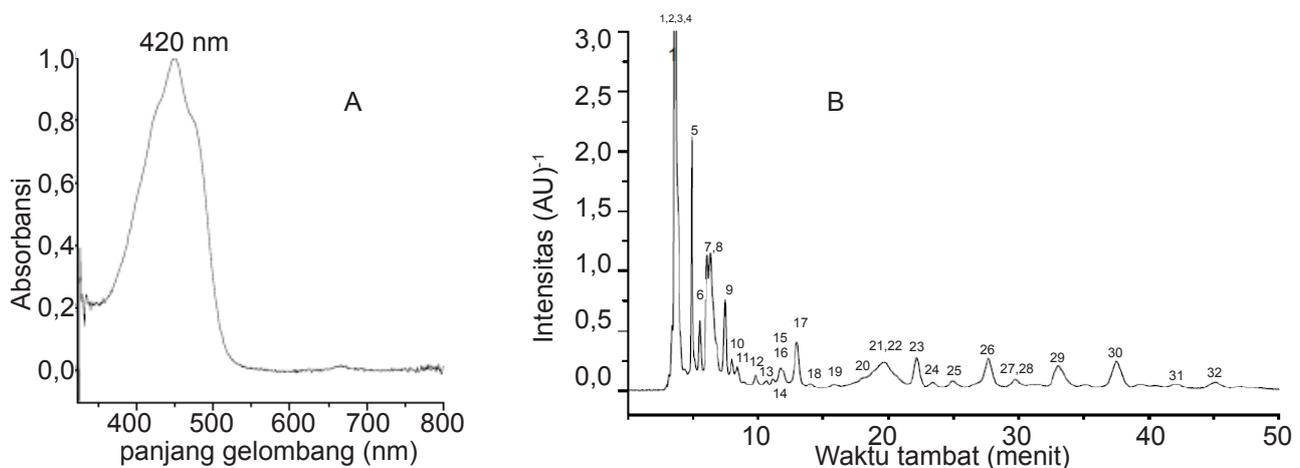
Seleksi (*screening*) pigmen pada tahap selanjutnya dilakukan menggunakan spektrofotometer ultra-violet tampak pada panjang gelombang 300-800 nm.

Spektrum ekstrak kasar pigmen dalam pelarut aseton (Gambar 6.A) menunjukkan bahwa bakteri hasil isolasi mengandung pigmen jenis karotenoid. Hasil ini sesuai dengan Jeffrey *et al.* (1997) yang menyatakan bahwa pola spektra karotenoid mempunyai puncak serapan pada panjang gelombang 300-500 nm (pada daerah cahaya tampak).

Puncak serapan karotenoid pada panjang gelombang cahaya tampak disebabkan oleh adanya kromofor, yaitu gugus tak jenuh kovalen yang dapat menyerap radiasi pada daerah-daerah UV dan tampak. Dalam sistem ini terjadi tumpang tindih orbital- π sehingga pemisahan energi antara tingkat dasar ke tingkat tereksitasi berkurang dan sistem menyerap pada panjang gelombang yang lebih panjang dengan kenaikan intensitas yang besar (Fessenden & Fessenden, 1986). Serapan tersebut terutama disebabkan oleh adanya sistem terkonjugasi $C = C - C = C - C$ pada karotenoid.

Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Senyawa yang berbeda memiliki polaritas yang berbeda pula. Dengan analisis kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) senyawa-senyawa akan terpisah menurut polaritasnya berdasarkan waktu retensi. Hasil analisis ekstrak kasar menggunakan KCKT disajikan pada Gambar 6.B. Kromatogram diamati pada panjang gelombang 475 nm karena pada panjang gelombang ini, terjadi pola pemisahan yang baik dibandingkan dengan pola pemisahan pada panjang gelombang yang lain. Pada gambar 6 terlihat ada 32 puncak. Setiap puncak merupakan indikasi keberadaan senyawa yang berbeda. Tinggi dan rendahnya puncak bervariasi, menunjukkan



Gambar 6. Hasil analisis ekstrak kasar pigmen bakteri Anemon Hijau. A: Spektrum ekstrak kasar pigmen dengan spektrofotometer UV-Vis Varian Cary 50. B: Kromatogram ekstrak kasar biopigmen pada panjang gelombang 475 nm dengan KCKT.



Gambar 7. Hasil uji kimia karotenoid tidak menunjukkan adanya perubahan warna. A: ekstrak kasar pigmen sebelum ditetesi SbCl_3 dan H_2SO_4 pekat. B: ekstrak kasar pigmen setelah ditetesi SbCl_3 dan H_2SO_4 pekat.

perbedaan konsentrasi senyawa-senyawa tersebut. Penjelasan ini menunjukkan bahwa bakteri Anemon Hijau mampu mensintesis jenis karotenoid yang berbeda dengan konsentrasi yang berbeda pula.

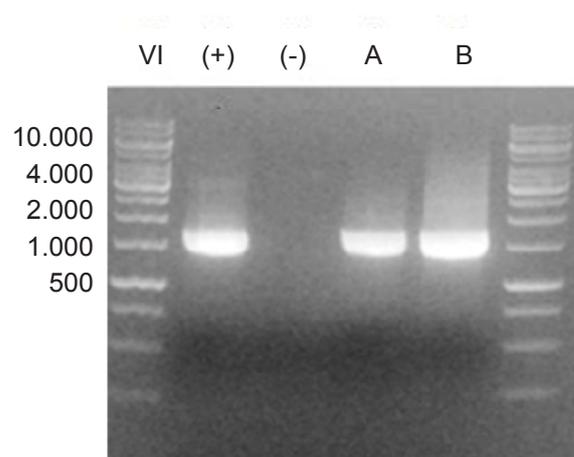
Karotenoid pada membran sel bakteri memiliki fungsi fotoproteksi yaitu dengan memerangkap spesies oksigen reaktif yang dihasilkan oleh radiasi cahaya matahari, sehingga tidak dapat merusak membran sel (Kopsell & Kopsell, 2006). Fungsi fotoproteksi dalam ekologi lautan tropis dimana cahaya matahari begitu kuat sepanjang tahun, menuntut adaptasi bagi organisme laut tropis untuk bertahan dari paparan cahaya matahari yang merusak. Diantara bentuk adaptasi tersebut adalah dengan mensintesis karotenoid yang bertanggung jawab atas warna merah sampai kuning, sehingga variasi warna organisme dari lautan tropis lebih kaya jika dibandingkan dengan lautan non tropis.

Karotenoid terdiri dari dua golongan utama yaitu karoten (karotenoid yang hanya terdiri atas unsur karbon dan hidrogen) dan xantofil (karotenoid teroksidasi, terdiri atas unsur karbon, hidrogen dan oksigen). Untuk mengetahui jenis karotenoid yang terkandung dalam bakteri anemon laut ini dilakukan uji epoksidasi menggunakan SbCl_3 dan H_2SO_4 pekat.

Hasil uji menunjukkan tidak terjadinya perubahan warna menjadi biru (larutan pigmen tetap berwarna kuning), sehingga mengindikasikan bahwa karotenoid yang dihasilkan oleh isolat bakteri adalah golongan Xantofil. Hasil ini dipertegas dengan munculnya banyak pita kromatogram KCKT pada waktu tambat yang panjang (> 15 menit) dengan metode Maeda *et al.* (2005) yang merupakan ciri pigmen-pigmen golongan karoten. Identifikasi lebih lanjut perlu dilakukan menggunakan NMR dan spektrometri massa.

Di bidang perikanan, karotenoid sebagai pigmen alami dapat dimanfaatkan sebagai zat aditif pakan untuk meningkatkan daya imunitas udang. Peningkatan daya imunitas tersebut akan mempengaruhi angka kelangsungan hidup dan laju pertumbuhan udang. Selain itu karotenoid juga berfungsi untuk melindungi udang dari radiasi sinar UV, dan sebagai penyedia provitamin A. Karotenoid juga dapat mempertinggi toleransi terhadap aras amonia dan kondisi rendah oksigen. Karotenoid dapat merangsang pertumbuhan, angka maturasi, peningkatan kesuburan, dan memperbaiki kualitas telur dalam proses reproduksi (Mahendra & Semangun, 2008).

Di bidang industri, pigmen alami dapat digunakan pada makanan dan obat-obatan. Makanan dan



Gambar 8. Elektroforesis PCR 16S rDNA. Berkas DNA, A: bakteri yang diisolasi dari *E. medusivora* B: bakteri yang diisolasi dari Anemon Hijau dengan panjang basa 1.500 bp, M: Marker, (+): Positif kontrol, (-): Negatif kontrol.

farmasi yang menggunakan pigmen alami juga mempunyai nilai tambah yang ditawarkan kepada konsumen. Makanan dengan pewarna karotenoid misalnya, mempunyai nilai tambah yang berasal dari sifat karotenoid dalam tubuh yaitu sebagai sumber vitamin A, antikanker dan anti obesitas (Gross, 1991; Maeda *et al.*, 2005).

Polymerase Chain Reaction 16S rDNA

Hasil pengecekan terhadap PCR 16S rDNA menunjukkan hasil positif dengan terdapatnya berkas DNA isolat BNL 2.1 dengan panjang basa yang sesuai yaitu sekitar 1.500 bp (Gambar 8).

Sekuensing

Hasil sekuen parsial gen 16S rRNA dari isolat BNL 2.1 yang diisolasi dari *E. medusivora* adalah sebagai berikut :

BNL 2.1 (665 nukleotida)

AGGCCACCTTTTAGGGCGGCTGGCTCCAAAAGG
 TACCCACCGACTTC GGGTGTACAACTCTCG
 T GGTGTGA CGGGCGGTGTGT ACAAGGCCCGG
 G AACGTATT CACCGCGGCATG CTGATCCGCG
 ATTACTAGCGATTCCAGCTTCATG TAGGCGAGTT
 GCAGCCTACAATCCGAAGTGA ACGGTTTTAT
 GAGATTAGCTCCACCTCGC GGTC TTGCAGC TC
 TTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCA
 GGTCATAAGGGGC ATGATGATTTGACGT CATC
 CCCACCTTCCTCCG GTTTGTACCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAA
 GATCAAGGG TTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC
 CCAACATCTCACGACA CGAGCTGACGACAACC
 ATGCACCACCTGTCACT CTGCT CCCGAAGGA

GAAACCCTATCTTTAGGGTTTTCAA AAGATG
 TCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
 GCTTCAA TAAACCACTTGCTCCCAGAAAAAA
 AAAAACCA CCAACCCCCAG AGAGAAAAGA
 CAAAAAAAAAATTAATGAAGAGAG GGAAGAA
 ACCCCCCCGGGGGGGGGGGGTTTTTTTTTCC
 CAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAACA

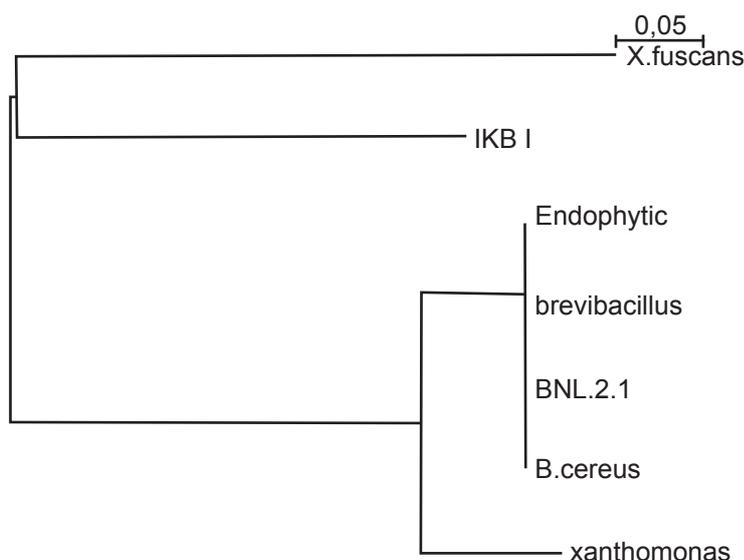
Hasil sekuen parsial gen 16s rRNA dari isolat IK-B1 yang diisolasi dari Anemon Hijau adalah sebagai berikut :

IK-B1 (319 Nukleotida)

CAATGATGGGGAACCGAGCTGACGACAGCCAT
 GCAGCACCTGTGTCACGGCTCCCGAAGGCACC
 AATCCATCTCTGGAAAGTTCCGTGCATGTCAAG
 GCCAGGTAAGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTA
 AACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC
 GTCAATTCCTTTGAGTTTTAGTCTTGCAGCCGTA
 CTCCCCAGGCGGCGAACTTAACGCGTTAGCTTC
 GATACTGAGGTCCTAATTGAACCCAACGCCTATTT
 CGCGTCGTTTTAGGGCATGGACTACCAAGGTATC
 TAATCCTGTTTGCTCCCCACAA

Analisis Data BLAST Homologi

Analisis sekuen DNA isolat bakteri dibandingkan dengan sekuen DNA pada basis data (*data base*) DNA (Altschul *et al.*, 1997). Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa bakteri yang berasosiasi dengan *E. medusivora* memiliki homologi sebesar 99% dengan *Bacillus cereus* dan bakteri IK-B1 yang diisolasi dari Anemon Hijau memiliki homologi sebesar 97% dengan *Xanthomonas* sp.



Gambar 9. Pohon filogenetik isolat BNL 2.1 (*Bacillus* sp.) dan IK-B1 (*Xanthomonas* sp.). Pohon filogenetik menunjukkan tingkat kekerabatan isolat dengan mikroorganisme yang lain.

Analisis Filogenetik

Analisis filogenetik bakteri dilakukan dengan membandingkan sekuen bakteri terdekat dengan sekuen 16S rDNA bakteri target pada *data base Gen Bank*. Sekuen diolah dengan program *ClustalX* (Isnansetyo & Kamei, 2003).

Kesimpulan dan Saran

Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri yang berasosiasi dengan anemon laut diantaranya senyawa anti bakteri dan biopigmen. Senyawa antibakteri dihasilkan oleh *Bacillus cereus*, yaitu bakteri yang berasosiasi dengan *E. medusivora*. Senyawa anti bakteri tersebut merupakan senyawa bioaktif yang disintesis oleh enzim *polyketide*. Sedangkan biopigmen dihasilkan oleh *Xanthomonas* sp. yang berasosiasi dengan Anemon Hijau. Biopigmen yang dihasilkan bakteri ini dapat digolongkan ke dalam jenis karotenoid. Senyawa-senyawa bioaktif tersebut memiliki banyak potensi untuk dimanfaatkan di bidang perikanan, industri maupun kesehatan.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Departemen Pendidikan Nasional atas beasiswa yang diberikan melalui program Beasiswa Unggulan di Magister Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana serta kepada Agus Sabdono dan seluruh pihak yang berkontribusi terhadap penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Ansari, M.Z. 1992. NRPS-PKS: A Knowledge-Based Resource for Analysis of NRPS/PKS Megasyntetases. *Nucleic Acids Res.* 32:405-413.
- Atschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 25:3389-3402.
- Britton, G., L. Jensen & H. Pfander. 1995. *Carotenoid*. Birkäuser Verlag Basel. Boston. Berlin.
- Bunch, A.W. & R.G. Harris. 1986. The Manipulation of Organism for the production of secondary metabolites. *In: Russel, G.G. (ed). Biotechnology and Genetic Engineering Review. Vol 4. Intercept Ltd. New Castle.* 117-144 pp.
- Burgess, J.G., E.M. Jordan, M. Bregu, A.M. Spragg & K.G. Boyd. 1999. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *J. Biotechnol* 70:27–32.
- Friese, E.U. 1993. *Sea Anemones as a Hobby*. TFH Publications. New Jersey. 365 p.
- Gross, J. 1991. *Pigments in Vegetables: chlorophylls and carotenoids*. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Isnansetyo, A. & Y. Kamei. 2003. *Pseudoalteromonas phenolica* sp.: a novel marine bacterium that produces phenolic anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* substances. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 53: 583-588.
- Istiqomah, I., Triyanto., A. Isnansetyo., H.N. Kamiso & M. Murdjani. 2004. Patogenisitas *Vibrio fluvialis* yang diisolasi Dari Kerapu Tikus (*Crimileptes altivelis*) dalam A. Irianto (Ed) Prosiding Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV. Purwokerto. 155-160.
- Jeffrey, S.W., R.F.C. Mantoura & S.W. Wright. 1997. *Phytoplankton pigments in oceanography*. United Nations Educational. Scientific and Cultural Organization, Paris.
- Kopsell, D.A. & D.E. Kopsell. 2006. Accumulation and Bioavailability of Dietary Carotenoids in Vegetable Crops. *Plant Sci.* 11: 499-507.
- Kuki, M., H. Nagae, R.J. Cogdell, K. Shimada & Y. Koyama. 1994. Solvent Effect on Spheroidene in Non Polar and Polar Solutions and The Environment of Spheroidene in The Light-Harvesting Complexes of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 as Revealed by Energy of the $^1\text{Ag} \rightarrow ^1\text{Bu}^+$ Absorbstion and The Frequencies of The Vibronically Coupled C=C Stretching Raman Lines in The ^1Ag and ^2Ag State. *Photochem. Photobiol.* 59:116-124.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko & J. Parker. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall. New Jersey.
- Maeda, H., H. Masashi, S. Tokute, F. Katsura & M. Kazuo. 2005. Fucoxanthin from Edible Seaweed, *Undaniria Pinnatifida*, Shows Antiobesity Effect Trough UCP1 Expression in White Adipose Tissues. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 332:392-397.
- Mahendra, E & H. Semangun. 2008. Karotenoid Dalam Budidaya Udang. Prosiding Back to Nature

- dengan Pigmen Alami-Seminar Nasional Pigmen 2008, Salatiga 5 September 2008: 386-395.
- Manitto, P. 1981. Biosintesis Produk Alami. IKIP Semarang Press. Semarang. 597 hlm (Alih Bahasa : Koensomardiyah).
- Piel, J. 2002. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 29: 99(22).
- Proksch, P., R.A. Edrada & R. Ebel. 2002. Drugs from the Seas – Current Status and Microbiological Implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 : 125-124.
- Radjasa, O.K. 2005. Eksplorasi Bakteri Laut Penghasil Metabolit Sekunder yang Berasosiasi dengan Karang Lunak Melalui Pendekatan Kultur dan Non Kultur; Usulan Penelitian Hibah Bersaing Perguruan Tinggi. Universitas Diponegoro. Semarang. (Tidak dipublikasikan).
- Radjasa, O.K., T. Martens, H.P Grossart, T. Brinkhoff, A. Sabdono & M. Simon. 2007. Antagonistic Activity of a Marine Bacterium *Pesueodaltromonas luteoviolacea* TAB 4.2 Associated with Coral *Acroporasp.* *J. Bio. Sci.* 7 (2): 239-246.
- Shiomi, K., T. Honma, M. Ide, Y. Nagashima, M. Ishida & M. Chino. 2003. An Epidermal Growth Factor-like Toxin and Two Sodium Channel Toxins from the Sea Anemone *Stichodactyla gigantea*. *Toxicon*. 41: 229-236.
- Terkina, I.A., V.V. Parfenova, & T.S. Ahn. 2006. Antagonistic Activity of Actinomycetes of Lake Baikal. *Appl. Biochem. Microbiol* 2006 42(2):173–176.
- Thiel, V & J.F Imhoff. 2003. Phylogenetic Identification of Bacteria with Antimicrobial Activities Isolated from Mediterranean Sponges. *Biomol. Engg.* 20:421-423.
- Zein, U. 2004. Diare Akut Infeksius Pada Dewasa. e-USU Repository Fakultas Kedokteran Divisi Penyakit Tropik dan Infeksi Bagian Ilmu Penyakit Dalam. Universitas Sumatera Utara. Sumatera Utara.