

## EKSPLORASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI POTENSIAL PENGHASIL SENYAWA ANTIFOULING YANG BERASOSIASI DENGAN ALGA COKLAT (PHAEOPHYTA) DI PERAIRAN KEPULAUAN KARIMUNJAWA JEPARA

Barri Pratama, Endang Kusdiyantini<sup>1</sup>, Agung Supriyadi<sup>1</sup>, Anto Budiharjo<sup>1</sup>, AB Susanto<sup>2</sup>

1. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Tembalang,  
Semarang 50275 Telepon (024)7474754; Fax. (024)76480690

2. Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro, Tembalang,  
Semarang 50275 Fax. 7474698  
e-mail: bary\_usaka7@yahoo.com

### ABSTRACT

Biofouling is a settlement process from marine organisms initiated by biofilm (microbial layers). Corrosion on the vessels, pipelines under the sea, oil plants, etc are big problems in the industrial today cause adversely affects. Antifouling paints have been developed to prevent settlement of organisms, however antifouling paints contain heavy metals and biocides which have toxic effects on marine ecosystems. Antifouling compound which environmental friendly is a solution for one of the paint component. The aim of this research was to isolate bacteria associated with brown algae which had potential to produce antifouling compound from Karimunjawa islands, Jepara. Isolate KS<sub>1</sub>-1 showed antifouling activity against *Pseudomonas aeruginosa* as biofilm-forming bacteria. This isolate had been characterized in morphology, molecular and biochemical identification. Molecular analyses of 16S rRNA sequence, KS<sub>1</sub>-1 showed similarity 94% from 287 bp with *Vibrio sp. W-137-16S ribosomal RNA gene, partial sequence*.

*Keywords : Antifouling, Phaeophyta, Biofouling, 16S rRNA, Vibrio*

### ABSTRAK

*Biofouling* merupakan proses penempelan organisme-organisme laut yang diinisiasi oleh bakteri pembentuk *biofilm*. Masalah yang cukup besar dalam dunia industri karena berkaitan dengan penyebab korosi pada kapal, pipa-pipa bawah laut, kilang minyak dan hal-hal yang berdampak merugikan oleh korosi peralatan utama dalam air. Penggunaan cat pelindung dinilai paling efektif untuk diaplikasikan, namun cat yang beredar saat ini mengandung komponen logam berat dan biosida yang toksik bagi ekosistem laut. Senyawa *antifouling* alternatif yang ramah lingkungan guna salah satu komponen cat pelindung merupakan solusi yang sedang dicari saat ini. Tujuan penelitian ini memperoleh isolat bakteri potensial penghasil senyawa antifouling yang berasosiasi dengan alga coklat di perairan Kepulauan Karimunjawa Jepara. Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah uji antimikroba terhadap bakteri pembentuk *biofilm* yaitu *Pseudomonas aeruginosa*. Zona bening yang diperoleh menunjukkan adanya kemampuan isolat bakteri dalam menghambat *biofouling*. Isolat unggul tersebut KS<sub>1</sub>-1, dikarakterisasi baik secara morfologi, molekuler, maupun biokimia. Analisis molekuler sekuens 16S rRNA isolat KS<sub>1</sub>-1 menunjukkan kemiripan 94% dari 287 basa dengan *Vibrio sp. W-137-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*.

*Kata kunci : Antifouling, Phaeophyta, Biofouling, 16S rRNA, Vibrio*

### PENDAHULUAN

*Biofouling* dalam lingkungan laut merupakan akumulasi dan pelekatan organisme laut baik yang bersifat mikro maupun makro pada permukaan yang kontak dengan air laut. Beberapa contoh *biofouling* seperti keramba apung, badan kapal, kawasan kilang minyak dan

peralatan lainnya yang biasanya ditempatkan di pelabuhan. Organisme *fouling* meliputi bakteri, alga, dan invertebrata seperti teritip dan serpulid (Yuliana, 2004).

Keberadaan *biofouling* memberikan dampak yang cukup signifikan terhadap gangguan dan kerusakan peralatan yang ada dibawah permukaan air. Menurunkan efisiensi

pelayaran suatu kapal, menyebabkan biaya bahan bakar meningkat, mahalnya biaya perbaikan karena kerusakan akibat korosi (karat) (Sabdono, 2005).

*Biofouling* turut mengganggu sirkulasi udara, makanan dan nutrien di dalam areal budidaya keramba jaring apung, sehingga pertumbuhan ikan kurang optimal. Pencegahan terhadap *biofouling* ini merupakan kunci menanggulangi kendala pengeluaran ekonomi yang cukup besar diakibatkan adanya penempelan biota tersebut.

Selama ini pencegahan *biofouling* khususnya pada lambung kapal dilakukan dengan menggunakan bahan kimia seperti arsen, tembaga, timah, silikon, kapur dan bahan merkuri. Senyawa *organotin* telah disintesis hampir 150 tahun yang lalu, namun baru pada tahun 1960 *tributyltin* (TBT) digunakan sebagai formula cat *antifouling*. Pada tahun 1970, sebagian besar kapal dilapisi dengan cat *antifouling* yang mengandung tin dan tembaga. Industri perkapalan sangat bergantung pada penggunaan TBT, cat *antifouling* sangat disukai oleh industri karena sangat efektif dan murah (Rittschof dan Mary, 2002).

TBT bukan hanya dikenal sebagai bahan *antifouling* yang paling efektif, tetapi juga merupakan biosida yang paling toksik dan tidak mudah terdegradasi di lingkungan alami. Kandungan yang dimiliki oleh TBT itu sendiri menyebabkan timbulnya pencemaran lingkungan karena merusak banyak kehidupan biota. Pelarangan pemakaian bahan tersebut untuk cat kapal secara efektif dimulai 17 September 2008 oleh Organisasi Maritim Internasional.

Beberapa proyek penelitian di Australia telah memfokuskan program *marine bioprospecting* pada deteksi, isolasi, identifikasi dan evaluasi bahan aktif alami *antifouling* dari alga laut, lamun, karang lunak dan sponge (Wetherbee, 2004). Lebih dari 2004 produk-produk alami telah berhasil diisolasi dari alga terutama dari divisi Rhodophyta, Phaeophyta dan Chlorophyta. Senyawa *tribromogramine*, *bromine*, *lipofilik* dan *sesquiterpen* merupakan

beberapa senyawa yang diperoleh dari alga laut (Munro & Blunt, 1999; Faulkner, 2001).

Eksplorasi terhadap bakteri laut masih belum banyak dilakukan karena sifatnya yang sebagian besar *non-cultivable*. Kurang dari 2% mikrobial telah berhasil diisolasi dari lingkungan laut sebagai kultur murni. Asosiasi mikroorganisme seperti halnya beberapa bakteri dengan organisme laut yang diduga juga mensintesa metabolit sekunder seperti organisme inangnya (Watermann, 1999).

Phaeophyta yang diketahui melimpah akan metabolit sekundernya dari ekosistem telah menjadi target pencarian sumber produk bioaktif alami. Peran penelitian ini diharapkan bahwa bakteri yang berasosiasi dengan Phaeophyta dapat memberikan kontribusi sebagai sumber alternatif baru bahan kimia laut guna pengembangan senyawa *antifouling*.

## METODOLOGI

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari 2013 sampai Desember 2013. Lokasi pengambilan sampel Phaeophyta adalah perairan Kepulauan Karimunjawa, Jepara. Isolasi bakteri, uji hambat, uji aktivitas mikrobiologi dan molekuler dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara.

### Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan saat pengambilan sampel dan peralatan ketika melakukan penelitian di laboratorium. Alat-alat pengambilan sampel di lapangan antara lain: peralatan *snorkeling*, pisau/*cutter*, kantong plastik, cetok, kamera, *cool box*, higrometer, lux meter, kertas label, buku dan alat tulis.

Peralatan yang diperlukan ketika di laboratorium mikrobiologi antara lain: bunsen, *petridisk*, *autoclave*, erlenmeyer, jarum ose, spatula, *hot plate and stirrer*, *spreader*, tabung reaksi, pipet, labu didih, labu takar, aluminium foil, timbangan, mikropipet, *paper disk*, gelas

ukur, mikroskop, *centrifuge*, tabung *ependorf*, *waterbath*, *freezer*, *DNA thermal cycler*, minimupid elektroforesis, *automatic squencer*, komputer, camera digital.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: beberapa jenis Phaeophyta diperoleh dari kepulauan Karimunjawa Jepara, *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli*, dan bakteri penghasil *biofilm* yaitu *Pseudomonas aeruginosa* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Kedokteran Universitas Diponegoro. Medium tumbuh bakteri yaitu media NB (*Nutrient Broth*), dan media NA (*Nutrient Agar*). Bahan kimia yang digunakan antara lain: maltosa, glukosa, fenol merah, NaCl, *alpha-naphthol*, NaOH, air laut steril, aquades, spirtus, alkohol 70%. Bahan yang digunakan pada uji molekuler antara lain: *chelex* 100 10%, primer 16S rRNA (primer 27F dan primer 1492R), *DNA marker*, *agarose*, *ethidium bromide*, *loading buffer*, *buffer* TAE.

## Cara Kerja

### a. Sampling

Pengambilan sampel dilakukan dengan metode *sampling purposif* yaitu suatu metode pengambilan sampel yang dilakukan dengan mengambil subjek bukan berdasarkan strata, random atau daerah tetapi berdasarkan atas adanya tujuan tertentu (Arikunto, 1993). Sampel Phaeophyta diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik tahan panas dengan sedikit air laut, diberi label sesuai dengan stasiun, waktu dan tanggal pengambilan. Sampel kemudian ditempatkan pada *cool box* dan dibawa menuju laboratorium Mikrobiologi, BBPBAP Jepara. Determinasi sampel Phaeophyta dapat dilakukan dengan menggunakan buku koleksi spesies perairan laut Indo Pasifik "*The Living Marine Resources of The Western Central Pacific Volume 1*".

### b. Isolasi Bakteri

Phaeophyta yang akan digunakan terlebih dahulu dibersihkan menggunakan air laut steril. Sampel Phaeophyta dipotong kecil-kecil kemudian dihancurkan menggunakan

mortar, selanjutnya ditimbang hingga 1 gr. Phaeophyta kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL air laut steril dengan demikian diperoleh pengenceran pertama atau  $10^{-1}$ . Pengenceran pertama ini kemudian digojog menggunakan vortex hingga homogen kemudian diambil 1 mL dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 mL air laut steril dan diperoleh pengenceran  $10^{-2}$  dan demikian selanjutnya hingga diperoleh pengenceran  $10^{-3}$ . Pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-3}$  diambil 100 $\mu$ L, selanjutnya disebarkan dan diratakan menggunakan batang penyebar steril pada cawan petri berisi media NA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam.

Purifikasi bakteri berikutnya dilakukan dengan metode goresan. Koloni bakteri dipisahkan dengan jarum ose berdasarkan perbedaan warna dan bentuk koloni pada media NA dalam cawan petri baru. Isolat murni diperoleh kemudian disimpan pada media agar miring.

### c. Uji Antimikroba

Bakteri uji dan seluruh hasil isolat bakteri Phaeophyta dipersiapkan terlebih dahulu yaitu dengan memindahkan satu ose isolat *S. aureus*, *E. coli*, dan *P. aeruginosa* serta masing-masing isolat Phaeophyta ke dalam medium NA kemudian diinkubasikan selama 24-48 jam pada suhu ruang. Masing-masing bakteri uji yang segar diinokulasikan ke dalam media NB, diinkubasi pada suhu kamar dengan kecepatan putaran 150 rpm selama 10-24 jam. Kultur bakteri diukur kekeruhannya dengan membandingkannya tabung standar McFarland.

Pada uji aktivitas antimikroba digunakan isolat bakteri Phaeophyta dengan kekeruhan standar McFarland no 1 sampai 3, sedangkan bakteri uji dengan kekeruhan standar McFarland lebih dari no 7. Metode yang digunakan uji aktivitas antimikroba adalah metode difusi agar dengan menyiapkan cawan petri steril berisi 20 mL media agar. Sebanyak 0,1 mL kultur bakteri uji dalam media cair yang telah diinkubasi selama 1 hari diinokulasikan

pada cawan petri tersebut dengan metode *spread* sampai merata dan didiamkan sekitar tiga menit supaya bakteri uji meresap pada media.

Bakteri yang digunakan sebagai uji antibakteri adalah *E. coli* dan *S.aureus*, sedangkan uji *antifouling* digunakan bakteri uji *P. aeruginosa*. Pengamatan dilakukan dengan mengukur zona hambat sekitar *paper disk* (diameter 6 mm) steril yang diletakkan aseptis pada permukaan agar lalu ditetesi 20  $\mu$ L isolat bakteri Phaeophyta yang telah dihomogenkan dan dikultur pada media NB. Media tersebut selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 2 x 24 jam. Diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,1 mm. Kontrol negatif yang digunakan adalah akuades steril sebanyak 20  $\mu$ L, kemudian diamati perbandingan zona hambat sekitar *paper disk* antara bakteri uji dan kontrol. Isolat yang paling berpotensi dalam menghambat pertumbuhan ketiga bakteri uji selanjutnya dikarakterisasi secara molekuler dan biokimia.

#### d. Karakterisasi Molekuler

Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode *chelex*. Metode ini dilakukan dengan cara memasukkan 3 (satu) ose kultur bakteri ke dalam *microtube* yang telah diberi 100  $\mu$ L *chelex* secara aseptis. Langkah selanjutnya, suspensi kemudian di-vortex selama 20 detik lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 detik. *Chelex* kemudian dipanaskan pada suhu 95°C selama 45 menit lalu di-vortex 40 detik dan disentrifugasi 2 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Ekstrak DNA disimpan hingga digunakan untuk amplifikasi.

Visualisasi produk PCR 16S rDNA ini dilakukan melalui elektroforesis dengan gel *agarose* berkonsentrasi 0,8%. Gel bervolume 50 mL maka cara pembuatannya adalah dengan melarutkan *agarose* sebanyak 0,4 gr ke dalam *buffer* TAE 0,5x dan memanaskannya hingga homogen. Larutan akan homogen kemudian tuang larutan ke dalam cetakan gel yang telah tersedia lalu biarkan hingga mengeras sebelum digunakan.

Elektroforesis dijalankan, sebelum itu terlebih dahulu produk PCR dan marker dimasukkan ke dalam sumur gel. Produk PCR dan *marker* tidak mengandung *loading buffer* maka 1  $\mu$ L *loading buffer* dapat ditambahkan dengan cara mencampurkannya terlebih dahulu di atas mika atau *parafilm*. Alat kemudian dijalankan dengan voltase 100 V selama  $\pm$  30 menit atau hingga warna biru produk PCR berada pada setengah bagian gel. Terakhir, pita hasil PCR dapat dilihat dengan menggunakan alat *gel-doc*.

*Sequencing* dilakukan di fasilitas *sequencing* DNA Laboratorium Biosains, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia. Analisis hasil *sequencing* dilakukan dengan menyelaraskan urutan nukleotida dengan sekuens yang diduga, yang terdapat dalam bank gen menggunakan program MEGA 5.05. Daerah yang memiliki kesamaan urutan sekuens dianalisis kembali menggunakan penyelarasan yang terdapat dalam fasilitas penyelarasan *Basic Local Allignment Search Tool* (BLAST) untuk menentukan persentase kesamaan pasangan basa dengan isolat referensi yang terdapat di bank gen.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini diawali dengan melakukan isolasi bakteri yang berasosiasi dengan alga coklat atau Phaeophyta yang diperoleh dari perairan Kepulauan Karimunjawa. Alga coklat yang digunakan antara lain *Padina minor*, *Sargassum cristaefolium*, *S. polycystum*, dan *Turbinaria ornata*.

Ciri morfologi yang ditunjukkan oleh alga coklat atau Phaeophyta antara lain: *P. minor* memiliki *thallus* yang melebar, berwarna coklat kehijauan dan tipis, menyerupai lembaran kertas seperti kipas, pada *thallus* memiliki guratan-guratan garis yang berpola. *P. minor* termasuk dalam Ordo Dictyotales.

*Sargassum* sp memiliki penampakan *thallus* yang cukup besar, coklat gelap hingga terang, terdapat ciri khas sebagai salah satu dari spesies alga coklat yaitu *vesicle* atau kantong

udara, dan biasa menempel pada batuan substrat menggunakan *holdfast*. *Sargassum* yang diperoleh dan digunakan sebagai sampel penelitian ini ada dua spesies, *S. polycystum* dan *S. cristaefolium*.

*T. ornata* memiliki *thallus* yang cukup besar, dengan warna coklat terang hingga coklat gelap, menempel pada substrat menggunakan *holdfast* dan penampakan keseluruhan yang menyerupai terompet sebagai ciri khusus. *Sargassum* dan *Turbinaria* termasuk alga coklat dengan ordo yang sama yaitu Ordo Fucales.

Teknik maserasi digunakan dalam perlakuan isolasi bakteri yang berasosiasi dengan alga coklat tersebut. Kurnia (2012) menjelaskan bahwa teknik maserasi adalah teknik yang dilakukan dengan cara menghancurkan sampel yang berbentuk padat dengan menumbuknya menggunakan mortar dan pastel, sehingga mikroba yang ada di permukaan atau di dalam sampel dapat terlepas, kemudian

dilanjutkan dengan pengenceran bertingkat menggunakan air laut steril.

Delapan belas isolat yang berasosiasi dengan alga coklat tersebut kemudian diuji untuk mengetahui senyawa bioaktif yang terkandung meliputi uji antibakteri dan uji *antifouling*. Uji antibakteri dilakukan terlebih dahulu dengan tujuan mengetahui aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen. Efek multifungsi dari zat bioaktif yang terkandung memungkinkan senyawa tersebut berinteraksi dengan proses *antifouling* (Fenical & Pawlik, 1991). Hasil uji aktivitas antibakteri antara isolat terhadap bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus* serta uji *antifouling* isolat bakteri terhadap *P. aeruginosa*.

Tabel 1. Aktivitas antibakteri dan *antifouling* isolat bakteri asosiatif alga coklat.

No	Isolat	Diameter Hambatan (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1.	Mp-2	-	-	9
2.	Mp-3	10.2	9.6	8
3.	Mp-4	-	-	8.2
4.	Cp-1	8.7	-	-
5.	Cp-2	-	7.8	7.4
6.	Cp-3	-	7.3	-
7.	Kp-1	7	-	-
8.	Kp-2	7.5	9.8	6.6
9.	Cs <sub>1</sub> -2	10.2	16	14.7
<b>10.</b>	<b>Ks<sub>1</sub>-1</b>	<b>12.2</b>	<b>18.1</b>	<b>7.6</b>
11.	Ks <sub>1</sub> -2	10.6	-	-
12.	Ks <sub>1</sub> -3	-	-	-
13.	Ks <sub>1</sub> -4	-	-	11.3
14.	Ms <sub>2</sub> -1	10.5	9.8	9.4
15.	Ms <sub>2</sub> -3	8.5	-	-
16.	Ks <sub>2</sub> -1	7.8	-	8.2
17.	Ks <sub>2</sub> -2	10.9	11.2	11.8
18.	Ct-2	-	-	11.6

Hasil zona hambat uji antibakteri terhadap bakteri uji *S. aureus* lebih besar dibandingkan bakteri uji *E. coli* pada isolat Ks<sub>2</sub>-2; Cs<sub>1</sub>-2; dan Ks<sub>1</sub>-1. Hal ini disebabkan

perbedaan struktur dinding sel kedua jenis bakteri tersebut, *S. aureus* merupakan bakteri Gram-positif sedangkan *E. coli* merupakan jenis bakteri Gram-negatif. Struktur dinding sel

bakteri Gram-positif relatif lebih sederhana dibandingkan bakteri Gram-negatif yang relatif kompleks.

Menurut Mpila, *dkk* (2012) kriteria kekuatan daya antibakteri yaitu pada diameter zona hambat 5 mm atau kurang dikategorikan lemah, zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat dan zona hambat lebih dari 20 mm dikategorikan sangat kuat. Kekuatan daya antibakteri tersebut menunjukkan isolat Ks<sub>2</sub>-2 dengan 11.8 mm; Cs<sub>1</sub>-2 dengan 14.7 mm; dan Ks<sub>1</sub>-1 dengan 7.6 mm memiliki kemampuan antibakteri dan *antifouling* yang kuat. Perbedaan tersebut lebih dikarenakan perbedaan kemampuan senyawa bioaktif yang dimiliki masing-masing isolat.

Isolat Ks<sub>1</sub>-1 merupakan salah satu isolat potensial yang menunjukkan hasil zona hambat terhadap *P. aeruginosa*, kemudian isolat ini dikarakterisasi secara molekuler dan biokimia untuk mendapatkan tingkat kekerabatannya dengan spesies bakteri yang sudah diketahui. Karakterisasi secara molekuler dilakukan dengan analisis sekuens gen 16S rRNA menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

### **Karakterisasi Molekuler**

Hasil isolasi DNA diamplifikasi menggunakan PCR dengan primer universal bakteri yaitu 27F dan 1492R. DNA yang menjadi target amplifikasi adalah daerah 16S

rRNA yang merupakan daerah konservatif dan urutan basanya bervariasi sehingga digunakan untuk menentukan hubungan kekerabatan bakteri ini (Pangastuti, 2006).

Hasil amplifikasi divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis yaitu suatu pemisahan DNA berdasarkan ukuran molekulnya dengan memberikan tegangan listrik. Panjang DNA isolat bakteri Ks<sub>1</sub>-1 dapat diketahui dengan membandingkan hasil visualisasi marker DNA *Ladder* yang memiliki ukuran maksimal 2000 bp. Hasil dari elektroforesis tersebut diperoleh pita DNA berukuran sekitar ± 900 - 1000 pb.

Berdasarkan target amplifikasi, diharapkan hasil amplifikasi diperoleh dengan jumlah ± 1500 pb sesuai dengan kode primer 16S rRNA. Hasil amplifikasi yang hanya berukuran ± 900 - 1000 pb bisa disebabkan beberapa hal, proses isolasi yang tidak optimal, tidak tepatnya penggunaan suhu saat PCR, dan atau hasil amplifikasi isolat bakteri Ks<sub>1</sub>-1 hanya memiliki ukuran tersebut.

Produk PCR tersebut selanjutnya dilakukan *sequencing* untuk menentukan urutan nuklotida. Hasil sekuens fragmen DNA Ks<sub>1</sub>-1 berupa susunan basa sebanyak 435 nukleotida. Basa sebanyak 435 nukleotida diperoleh jauh dari hasil elektroforesis yang ± 900 - 1000 pb disebabkan *sequencing* hanya menggunakan primer *forward* 27F saja, selain itu banyaknya basa nukleotida yang tidak mampu dibaca dengan baik.

Gambar 1. Urutan basa nitrogen hasil *sequencing* isolat Ks<sub>1</sub>-1 5'F-3'R.

5' -1	GGGAGGTCGA	GCGTCTAGCC	ATGCGAGTCG	AGCGGCAGCG	40
41	ACTGCATTGA	ACCTTCGGGG	GATTTGTTGG	GCGGCAGCG	80
81	GCGGACGGGT	GAGTAATGCC	TGGGAAATTG	CCCTGATGTG	120
121	GGGGATAACC	ATTGGAAACG	ATGGCTAATA	CCGCATGATG	160
161	GCTTCGCCCC	AAAGAGGGGG	ACCTTCCGGC	CTCTCGCGTC	200
201	AGGATATGCC	CCGGTGGGAT	TAGCTAGTTG	GTGAGGTAAG	240
241	GGCTCACCAA	GGCGACAATC	CCTTTGTGGT	CTGAGAGGAT	280
281	GACCCGCCAC	TCTGGAAGT	ACCCAAAAA	AAAAAAATA	320
321	CGGGGGGTTT	CCGTGGGCAA	TGTTCTTAT	AGATCAGCAG	360
361	GGCTGTGGAC	CAATGCATGG	TTAGGGATCA	CGAGCTTGAG	400
401	GGAATAGTAC	AGGGGAGATG	CGGCCTGCGG	TGGTT	435 - 3'

Keterangan: A = adenin; T = timin; G = guanin; C = sitosin.

Analisis homologi dari sekuens tersebut dilakukan dengan menggunakan penelusuran BLAST dan dari *GenBank* diperoleh tingkat homologi sebesar 94% dengan bakteri *Bacterium X18* 16S ribosomal RNA gene, *partial sequence* (Gambar 2.) dan *Vibrio* sp. W-137-8 16S ribosomal RNA gene, *partial sequence* (Gambar 3.). Analisis pohon fenogram

disajikan pada Gambar 4. Hagstrom *et al.*, (2000), menjelaskan bahwa isolat yang mempunyai persamaan sekuen 16S rRNA lebih dari 97% dapat mewakili spesies yang sama, sedangkan persamaan sekuen antara 93% - 97% dapat mewakili identitas bakteri pada tingkat genus tetapi bisa berbeda spesies.

Bacterium X18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [gi|125433761|gb|EF203006.1](#)|Length: 1086Number of Matches: 1  
Related Information  
Range 1: 11 to 297[GenBankGraphics](#)[Next Match](#)[Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	442 bits(239)	2e-120	271/287(94%)	0/287(0%)	Plus/Plus
Query	15	CTAGCCATGCGAGTCGAGCGGCAGCGACTGCATTGAACCTTCGGGGGATTTGTTGGGCGG	74		
Sbjct	11	CTACCCATGCAAGTCGAGCGGCAGCGACAACATTGAACCTTCGGGGGATTTGTTGGGCGG	70		
Query	75	CGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTG	134		
Sbjct	71	CGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTG	130		
Query	135	GAAACGATGGCTAATACCGCATGATGGCTTCGCCCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCT	194		
Sbjct	131	GAAACGATGGCTAATACCGCATGATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCT	190		
Query	195	CGCGTCAGGATATGCCCGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCG	254		
Sbjct	191	CGCGTCAGGATATGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCG	250		
Query	255	ACAATCCCTTTGTGGTCTGAGAGGATGACCCGCCACTCTGGAAGTGA	301		
Sbjct	251	ACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGA	297		

Gambar 2. Analisis homologi sekuen isolat Ks<sub>1</sub>-1 (12376208) menggunakan *GenBank* database memiliki persamaan 94% dari 287 basa dengan Bacterium X18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Vibrio sp. W-137-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [gi|573974037|gb|KF746898.1](#)|Length: 1431Number of Matches: 1  
Related Information  
Range 1: 1 to 286[GenBankGraphics](#)[Next Match](#)[Previous Match](#)

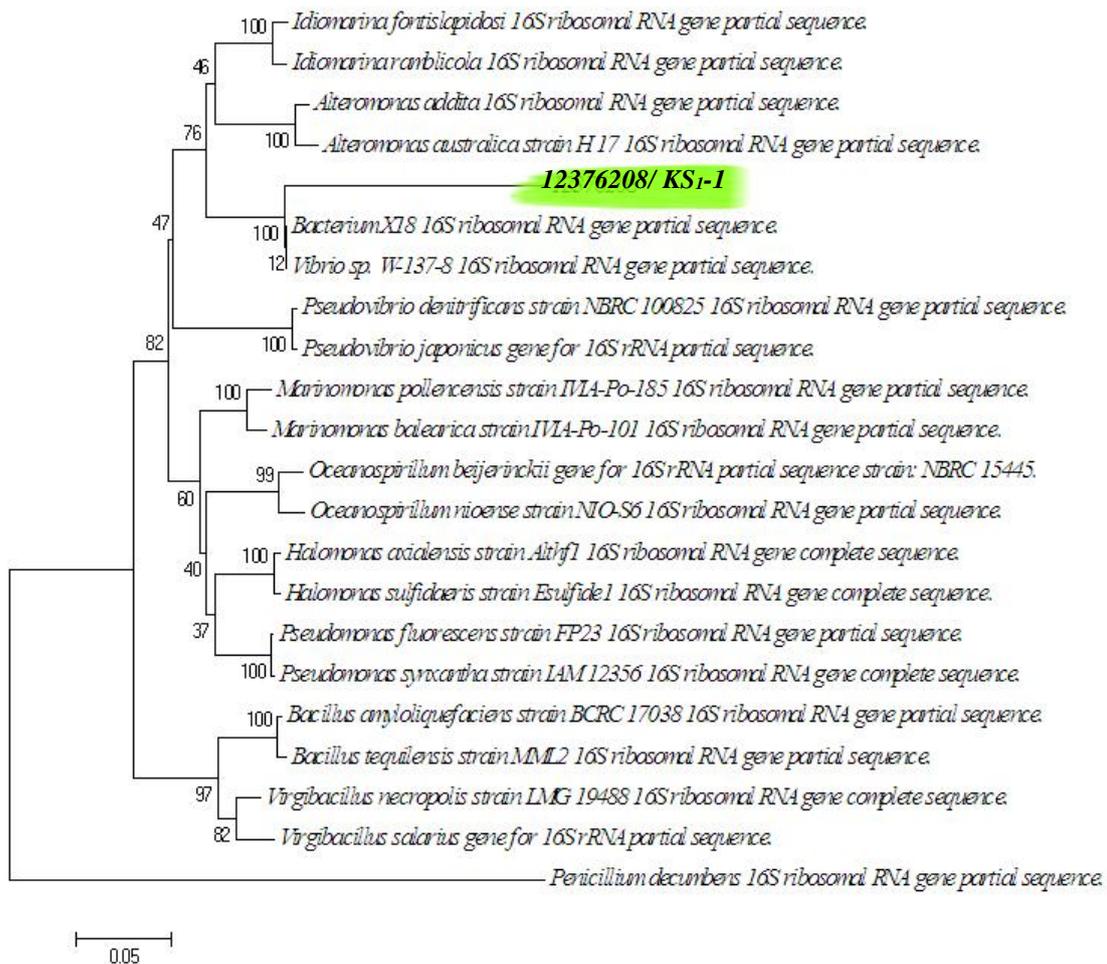
Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	440 bits(238)	6e-120	271/287(94%)	1/287(0%)	Plus/Plus
Query	15	CTAGCCATGCGAGTCGAGCGGCAGCGACTGCATTGAACCTTCGGGGGATTTGTTGGGCGG	74		
Sbjct	1	CTA-CCATGCAAGTCGAGCGGCAGCGACAACATTGAACCTTCGGGGGATTTGTTGGGCGG	59		
Query	75	CGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTG	134		
Sbjct	60	CGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTG	119		
Query	135	GAAACGATGGCTAATACCGCATGATGGCTTCGCCCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCT	194		
Sbjct	120	GAAACGATGGCTAATACCGCATGATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCT	179		
Query	195	CGCGTCAGGATATGCCCGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCG	254		
Sbjct	180	CGCGTCAGGATATGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCG	239		
Query	255	ACAATCCCTTTGTGGTCTGAGAGGATGACCCGCCACTCTGGAAGTGA	301		
Sbjct	240	ACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGA	286		

Gambar 3. Analisis homologi sekuen isolat Ks<sub>1</sub>-1 (12376208) menggunakan *GenBank* database memiliki persamaan 94% dari 287 basa dengan *Vibrio* sp. W-137-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Hasil analisis sekuens dilanjutkan dengan merekonstruksi pohon fenogram. Pohon fenogram dikonstruksi dengan menggunakan *neighbor joining* (NJ) yang dimiliki aplikasi

MEGA 5.1 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), menunjukkan tingkat kekerabatan isolat Ks<sub>1</sub>-1 dengan beberapa bakteri penghasil senyawa *antifouling*.



Gambar 4. Pohon fenogram isolat Ks<sub>1</sub>-1 (12376208) dengan *Bacterium X18* 16S ribosomal RNA gene, *partial sequence*; *Vibrio* sp. W-137-8 16S ribosomal RNA gene, *partial sequence* dan beberapa bakteri kerabatnya.

### Karakterisasi Molekuler

Karakterisasi aktivitas biokimia merupakan langkah berikutnya untuk mengkonfirmasi persamaan antara isolat Ks<sub>1</sub>-1 dengan genus yang diduga, *Vibrio* sp. Berdasarkan petunjuk Buchanan dan Gibbons

(1974) karakter *Vibrio* sp. antara lain bakteri Gram-negatif, bentuk batang, motilitas, positif oksidase. Umumnya memproduksi butilin, glikol dari glukosa, beberapa proteolitik, dan beberapa memproduksi indol, juga merupakan anaerob fakultatif. Hasil karakterisasi isolat Ks<sub>1</sub>-1 disejajarkan dengan jenis-jenis *Vibrio* sp.

Uji pati memperoleh hasil positif menunjukkan kemampuan isolat dalam mengubah polisakarida menjadi sakarida yang lebih sederhana dengan menggunakan enzim amilase. Uji glukosa, arabinosa dan sukrosa diketahui positif memberikan informasi bahwa isolat bakteri dalam melakukan fermentasi karbohidrat menghasilkan beberapa produk akhir berupa asam. Kemampuan lainnya yaitu isolat bakteri K<sub>S1</sub>-1 pada hasil VP negatif, menunjukkan bahwa isolat tersebut tidak dapat menghasilkan senyawa *acetoin* sebagai hasil fermentasi glukosa. Isolat K<sub>S1</sub>-1 menunjukkan ketidak-mampuan untuk tumbuh pada media dengan kadar NaCl 0% seperti halnya *Vibrio* sp.

Bakteri *Vibrio* sp. merupakan jenis bakteri yang sering ditemui di perairan laut. *Vibrio* sp. ditemukan pada banyak permukaan eksterior eukariota laut, khususnya zooplankton. Lampiran permukaan yang disertai dengan produksi EPS atau Eksopolisakarida menjadi faktor penentu terhadap terbentuknya zona bening pada uji *antifouling*.

## SIMPULAN

Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa hasil isolasi diperoleh isolat K<sub>S1</sub>-1 yang memiliki potensi menghasilkan senyawa *antifouling*. Isolat dengan kode K<sub>S1</sub>-1 memiliki kemampuan besar dalam menghambat bakteri pembentuk *biofilm Pseudomonas aeruginosa*. Isolat K<sub>S1</sub>-1 tersebut berdasarkan karakterisasi morfologi, biokimia serta molekuler mendekati dengan spesies *Vibrio* sp.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arikunto, S. 1993. *Prosedur Penelitian, Suatu Pendekatan Praktek*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Buchanan, R.E. dan N.E. Gibbons. 1974. *Bergey Manual of Determinative Bacteriology 8<sup>th</sup> Edition*. Baltimore USA: The Williams & Wilkins Company.
- Faulkner, D.J. 2001. *Marine Natural Product*. Natural Product Rep. Journal, 18(3): 1-49
- Fenical, W. & Pawlik, J.R. 1991. *Defensive Properties of Secondary Metabolites from the Caribbean Gorgonian Coral Erythropodium Caribaeorum*. Mar Ecol Prog Ser, 75(4): 1-8
- Hagstrom, A., Pinhassi, J., Zweifel, U.L. 2000. *Biogeographical Diversity among Marine Bacterioplankton*. Aquat Microb Ecol, 21(1): 231-244
- Kurnia, A. 2012. *Isolasi Bakteri*. <http://www.scribd.com/doc/73251543/Materi-Praktikum>. Agustus 2012
- Mpila, D.A., Fatimawali, Weny, I. dan Wiyono. 2012. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mayana (Coluca atropurpureus L Benth) Terhadap Staphylococcus aureus, Escherichia coli dan Pseudomonas aeruginosa Secara In-Vitro*. FMIPA Unsrat. Manado.
- Munro, M.H.G. dan J.W. Blunt. 1999. *Marinlit, version 10.4*. Marine Chemical Group, University of Canterbury, Christchurch. New Zealand.
- Pangastuti, A. 2006. *Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16S rRNA dan Gen Penyandi Protein*. Jurnal Biodiversitas Bio, 7(3): 292-296
- Rittchof, D. dan Mary, A. 2002. *Biofouling*. Poseidon Ocean Sciences. Inc. <http://www.poseidonsciences.com/antifouling.html>.
- Sabdon, A. 2005. *Eksplorasi Senyawa Bioaktif Antifoulant Bakteri yang Berasosiasi dengan Avertebrata Laut Sebagai Alternatif Penanganan Biofouling di Laut*. Pusat Studi Pesisir dan Laut Tropis Universitas Diponegoro. Semarang.
- Watermann, B. 1999. *Alternative Antifoulant Techniques Present and Future*. Limno.Mar, 1(6): 1-6
- Wetherbee, R. 2004. *Replacements for Toxic Antifouling Agents*. School of Botany, The University of Melbourne. Melbourne.
- Yuliana, M. 2004. *Formulasi dan Uji Aktivitas Antifouling dari biji Jarak Pagar (Jatropha curcas Linn.), Kulit Pohon Salam (Eugenia polyantha), dan Hati Ikan Cucut Lanyam*

(*Carcharhinus limbatus*). IPB. Bogor.

Skripsi.