

SENYAWA BIOAKTIF BAKTERI SIMBION PADA KARANG LUNAK *Sinularia flexibilis* DAN *S. polydactyla*

BACTERIAL SYMBIONT BIOACTIVE COMPOUND OF SOFT CORAL Sinularia flexibilis AND S. polydactyla

Rozirwan^{1*}, Dietriech G. Bengen², Chaidir³, Neviaty P. Zamani², dan Hefni Effendi²

¹Program Studi Ilmu Kelautan, FMIPA, Universitas Sriwijaya, Ogan Ilir, Sumatera Selatan

²Departemen Ilmu dan Teknologi Kelautan, FPIK, Institut Pertanian Bogor, Bogor

³Pusat Teknologi Farmasi dan Medika, BPPT, Jakarta

*E-mail: rozirwan@gmail.com

ABSTRACT

Symbiont bacteria on soft coral can produce bioactive compounds that plays an important role in chemical ecology and as a marine natural product. The purpose of this study was to find and characterize the antibacterial activities of active compounds extracted from bacterial symbionts of soft coral S. flexibilis and S. polydactyla. The methods used in this study were culture and isolation of bacterial symbionts, extraction of compounds, antibacterial bioassay, and identification of bioactive compounds using the LC-MS analyses. Four isolates of bacterial symbionts were obtained from two samples of soft corals, 2 isolates of Pseudomonas diminuta (A1) and Edwardsiella hoshinae (A2) from soft coral S. flexibilis, and 2 isolates of E. hoshinae (B1) and P. acidovorans (B4) from S. polydactyla. Antibacterial activity were found only from the extracts of bacterial symbionts P. diminuta (A1) and from S. flexibilis about $10.16 \pm 0.3\text{mm}$ (for B. subtilis), $8.66 \pm 0.8 \text{ mm}$ (E. coli) and $9.86 \pm 1.7\text{mm}$ (S. dysentri). No antibacterial activity found from the extracts of S. polydactyla. The results of LC MS analysis showed that the group of diterpenes sinularin produced by soft corals S. flexibilis and bacterial symbionts isolates of P. diminuta (A1).

Keywords: Bacterial Symbiont, Bioactive Compound, Antibacterial Activity, Soft Coral, *Sinularia flexibilis*, *Sinularia polydactyla*

ABSTRAK

Bakteria simbion pada karang lunak dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang berperan penting secara ekologi kimia dan sebagai produk alamia laut. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan isolat bakteri simbion dari karang lunak spesies *S. flexibilis* dan *S. polydactyla* yang berpotensi menghasilkan senyawa bioaktif. Metodologi penelitian ini dilakukan seperti mengisolasi, karakterisasi bakteri simbion, kulturisasi dan ekstraksi, bioassai antibakteri dan identifikasi senyawa bioaktif menggunakan analisis LC-MS. Hasil menunjukkan, ada empat isolat bakteri simbion telah diperoleh dari dua sampel karang lunak, dimana 2 isolat *Pseudomonas diminuta* (A1) dan *Edwardsiella hoshinae* (A2) dari spesies *S. flexibilis*, dan 2 isolat *E. hoshinae* (B1) dan *P. acidovorans* (B4) dari spesies *S. polydactyla*. Aktivitas antibakteri ditemukan hanya pada bakteri simbion *P. diminuta* (A1) dari spesies *S. flexibilis* berkisar $10.16 \pm 0.3\text{mm}$ (untuk *B. subtilis*), $8.66 \pm 0.8 \text{ mm}$ (*E. coli*) dan $9.86 \pm 1.7\text{mm}$ (*S. dysentri*), dan tidak ditemukan dari isolat spesies *S. polydactyla*. Berdasarkan hasil analisis LC-MS menunjukkan kelompok senyawa diterpen Sinularin yang dihasilkan karang lunak *S. flexibilis* ditemukan juga dihasilkan isolat bakteri simbion *P. diminuta* (A1).

Kata kunci: Bakteri Simbion, Karang Lunak, Senyawa Bioaktif, *Sinularia flexibilis*, *Sinularia polydactyla*

I. PENDAHULUAN

Pemanfaatan senyawa bioaktif pada karang lunak secara terus menerus dapat mengancam kelestariannya di perairan karena pertumbuhan biota ini relatif lambat. Menurut Arafat (2009) laju pertumbuhan spesies *Sinuaria dura* berkisar 0,07-0,24 cm per bulan dan lebar 0,08-0,28 cm per bulan. Oleh karena itu, berbagai upaya dilakukan dalam mempertahankan sumberdaya tersebut di alam, diantaranya kajian mikroorganisme yang bersimbiosis dengan karang lunak itu. Bakteri simbion pada karang diduga dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang mirip dengan karang lunak sebagai inangnya.

Isolat bakteri simbion *Pseudomonas* sp yang diperoleh dari karang lunak *S. polydactyla* menunjukkan aktivitas antibakteri dengan terdeteksinya zona inhibisi dengan diameter berkisar 15,76 mm (Radjasa *et al.*, 2007). Pada *Sinularia* sp juga berhasil diisolat dua bakteri simbion yang memproduksi senyawa aktif yang menunjukkan sebagai antibakteri Tuberculosis (Sulistiyani *et al.*, 2010). Apabila terbukti senyawa bioaktif pada isolat bakteri simbion mirip dengan inangnya maka produksi senyawa bioaktif akan lebih mudah dan tidak merusak habitat karang lunak karena bakteri mudah dikembangkan atau dikultur di laboratorium sehingga dapat menghasilkan senyawa bioaktif dalam jumlah yang banyak. Isolat bakteri simbion dari karang lunak berhasil ditumbuhkan dalam media Marine Agar (Zheng *et al.*, 2005). Begitu juga bakteri simbion pada spon juga berhasil dengan mudah tumbuh dalam media Zobell (Anand *et al.*, 2006). Media agar zobell 2216E juga digunakan dalam mengisolasi bakteri simbion dari karang lunak *Sinularia* sp dan *Lobophytum* sp (Radjasa *et al.*, 2007; Sulistiyani *et al.*, 2010).

Isolasi senyawa bioaktif pada bakteri simbion ini dapat menjadi salah satu alternatif dalam upaya pemanfaatan senyawa bioaktif pada karang lunak tanpa merusak ekosistem perairan. Kajian ini dilakukan untuk mene-

mukan jenis-jenis bakteri simbion penghasil senyawa bioaktif pada karang lunak *S. flexibilis* dan *S. polydactyla* dan menentukan kemiripan senyawa bioaktif yang diproduksi keduanya.

II. BAHAN DAN METODE

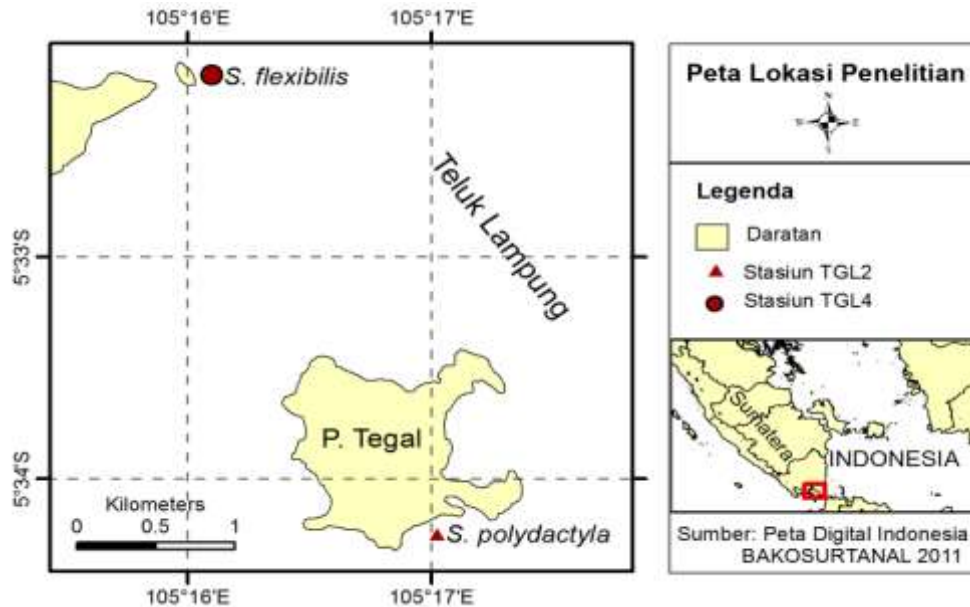
Pengambilan sampel karang lunak *Sinularia flexibilis* dan *S. polydactyla* dilakukan pada bulan Maret 2014 dengan menggunakan alat selam SCUBA yang berlokasi di perairan Pulau Tegal, Teluk Lampung (Gambar 1). Sampel bakteri simbion ditumbuhkan, dimurnikan dan diidentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA, Universitas Sriwijaya pada bulan Maret-Agustus 2014. Kultur dan bioassai aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Biologi Laut FMIPA, Universitas Sriwijaya pada bulan Agustus-September 2014. Analisis keragaman senyawa bioaktif dilakukan di Lab tiap BPPT Serpong pada bulan November 2014 sampai Maret 2015.

2.2. Penanganan Sampel dan Penumbuhan Bakteri Simbion

Bakteri simbion pada karang lunak diambil pada bagian endofitik dengan prosedur meliputi: sampel karang dicuci dengan air laut steril. Sampel diiris-iris menjadi tipis dan dimasukkan ke dalam media pertumbuhan Zobell cair dengan perbandingan 1:9 (g/v) (Tabel 1). Sampel *dishaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu kamar selama 4 hari. Indikasi pertumbuhan bakteri ditandai dengan perubahan warna media tumbuh menjadi keruh kecoklatan. Untuk tindakan pemurnian/isolasi sampel ditumbuhkan (*planting*) pada media zobell padat (Benson, 2002).

2.3. Isolat dan Karakterisasi Bakteri Simbion

Langka-langka isolasi bakteri meliputi sampel bakteri simbion diencerkan bertingkat (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6}).



Gambar 1. Peta lokasi pengambilan sampel karang lunak.

Tabel 1. Komposisi media pertumbuhan zobell (Modifikasi dari Atlas, 2005).

Bahan	Total
Agar ¹⁾	15,0 g
Peptone	2,5 g
Yeast Extract	0,5 g
Air Laut	1,0 l

¹⁾ditambahkan untuk Zobell Padat

Pada sampel pengenceran ketiga terakhir dilakukan penanaman dengan dituangkan sebanyak 1 mL masing-masing cawan petri. Kemudian dituangkan media zobell berkisar 20 mL per cawan, sambil dihomogenkan dengan digoncang pelan sampai media menjadi padat. Cawan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 4 hari, metode ini merujuk pada metode Benson (2002). Karakterisasi dilakukan pada masing-masing koloni bakteri simbiosis dengan pengamatan morfologi sel meliputi; pewarnaan gram, endospore dan motilitas (Hadioetomo, 1993; Cappucino and Sherman, 2008). Untuk uji biokimia meliputi; hidrolisis pati, hidrolisis gelatin, produksi H₂S dan *Triple Sugar Iron* (TSI) (Lay, 1994), hidrolisis kasein (Collins *et al.*, 1985), fermentasi karbohidrat (glukosa,

sukrosa dan laktosa), reduksi nitrat dan produksi indol (Benson, 2002), produksi urease, metil merah (*methyl red*), Voges-proskauer dan Simmon's sitrat (Cappucino dan Sherman, 2008).

2.4. Kultur dan Ekstraksi Bakteri Simbiosis

Kulturasasi dilakukan pada bakteri simbiosis yang sudah murni. Masing-masing koloni bakteri dibiakkan pada media Zobell secara bertingkat mulai dari 10 ml, 100 ml dan 500 ml. Isolat bakteri diinokulasi sebanyak 2-3 ose ke media zobell cair sebanyak 10 ml dalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Biakan dipindahkan ke media zobell 100 ml dalam labu erlenmeyer 250 ml dan digoyang dengan kecepatan 100 rpm pada suhu 37 °C selama 48 jam. Kultur dituangkan pada media zobell 500 ml dan inkubasi pada suhu 37 °C selama 72 jam. Isolat bakteri simbiosis ditumbuhkan pada media zobell cair sebanyak 500 ml selama 15 hari. Kultur bakteri dipanen, kemudian dimeserasi dengan pelarut EtOAc (1:3 v/v) selama 3 hari. Selanjutnya larutan hasil rendaman dievaporasi pada suhu 45 °C sampai membentuk ekstrak berupa pasta, kemudian disimpan pada suhu 4 °C (Zheng *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2012).

2.5. Bioassai Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Isolat Bakteri Simbion

Bakteri uji yang digunakan adalah *B. subtilis*, *E. coli* dan *S. dysentri*. Bakteri uji diremajakan pada media nutrien agar (NA) dalam cawan petri. Paper disk menggunakan pinset dicelupkan ke dalam ekstrak isolat bakteri simbion dan dengan perlahan diletakkan di atas media NA yang sebelumnya telah ditanam bakteri uji. Kegiatan ini dilakukan secara aseptik. Setelah itu media uji tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Daya hambat antibakteri diukur zona bening yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong (Anand *et al.*, 2006).

2.6. Analisis Komponen Metabolit Sekunder

Analisis kandungan metabolit sekunder dilakukan terhadap ekstrak dari sampel *Sinularia flexibilis* dan isolat bakteri yang memiliki aktivitas anti-bakteri. Hal ini bertujuan untuk membandingkan kemiripan profil senyawa aktif yang dihasilkan. Sebanyak 10 µL sampel diinjeksikan ke sektor kolom symmetry C18,5 µm, 150x4,6 mm, LC-MS (Tandem HPLC Alliance 2695 dengan ESI-Tof-MS LCT Premier-XE, Waters) dengan menggunakan fase gerak MeOH (A%) dan H₂O (B%). Laju elusi 0,2 ml/menit dan dilakukan pada suhu ruang dengan mode gradient timetable (Tabel 2). Metode tahapan ini merujuk metode modifikasi dari Margereth, (2012).

Tabel 2. *Timetable gradient* perlarut analisis LCMS.

Waktu (menit)	MeOH (A%)	H ₂ O (B%)
0	10	90
5	25	75
10	50	50
15	75	25
20	50	50
25	25	75
30	10	90

Sektor MS dioperasikan dengan mode positif dengan kondisi meliputi: Capillary voltage: 2100 V, Sample cone voltage: 60 V, Desolvation T: 300 dC, Source T: 120 dC, Desolvation gas: 500 l/h dan Cone gas: 10 L/h. Spektrum LC-MS diidentifikasi dengan cara perbandingan dengan bantuan data base ChemSpider (Margeretha, 2012).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Hasil

3.1.1. Jenis-jenis Bakteri Simbion

Hasil isolasi bakteri simbion dari kedua jenis karang lunak *S. flexibilis* (SFTLS4) dan *S. polydactyla* (SPTLS2) diperoleh delapan isolat bakteri, empat isolat bakteri dari SFTLS4 yang diberi label A1-A4 dan empat isolat bakteri dari SPTLS2 dengan label B1-B4.

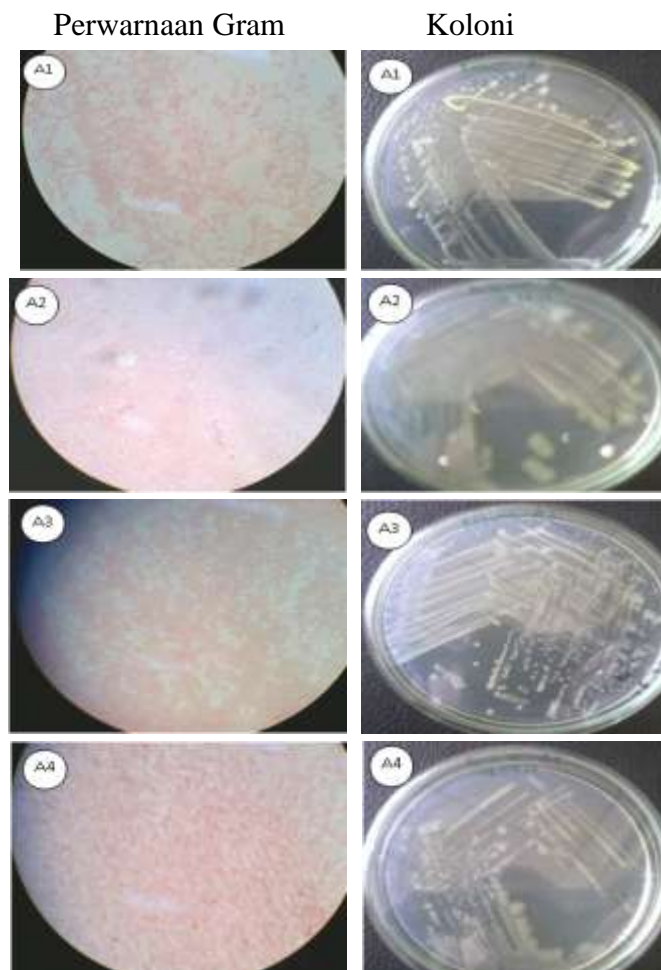
Berdasarkan pengamatan morfologi, empat isolat bakteri simbion SFTLS4 menunjukkan karakteristik yang sama. Kesamaan ini ditunjukkan pada hasil pengamatan secara makroskopis, dimana bentuk koloninya adalah *Circular, entire, convex, unpigmented, translucent* (Tabel 3).

Pengamatan mikroskopis menunjukkan seluruh isolat memiliki sel berbentuk batang dan tidak menghasilkan endospor. Hasil pewarnaan gram juga menunjukkan bahwa semua isolat menghasilkan warna merah, ini artinya bahwa isolat bakteri A1-A4 tersebut dikelompokkan pada bakteri gram negatif (Gambar 2). Hasil pengamatan morfologi, empat isolat bakteri simbion SPTLS2 menunjukkan karakteristik yang sama. Kesamaan ini ditunjukkan pada hasil pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis, dimana bentuk koloninya adalah *Circular, entire, convex, unpigmented, translucent*. Untuk bentuk sel adalah batang, gram negatif, tidak menghasilkan endospora dan motil (Tabel 4).

Pengamatan mikroskopis lainnya juga menunjukkan seluruh isolat memiliki sel berbentuk batang dan tidak menghasilkan endospore. Hasil pewarnaan gram menunjuk-

Tabel 3. Hasil pengamatan morfologi isolat bakteri (A1-A4) dari karang *S. flexibilis*.

Morfologi Isolat	Isolat bakteri simbion			
	A1	A2	A3	A4
Makroskopis koloni	<i>Circular, entire, convex, unpigmented, translucent.</i>	<i>Circular, entire, convex, unpigmented, translucent.</i>	<i>Circular, entire, convex, unpigmented, translucent.</i>	<i>Circular, entire, convex, unpigmented, translucent.</i>
Mikroskopis sel	Sel berbentuk batang, Gram Negatif, Tidak menghasilkan endospora.	Sel berbentuk batang, Gram Negatif, Tidak menghasilkan endospora.	Sel berbentuk batang, Gram Negatif, Tidak menghasilkan endospora.	Sel berbentuk batang, Gram Negatif, Tidak menghasilkan endospora.
Motilitas	Motil	Motil	Motil	Motil



Gambar 1. Pewarnaan Gram dan bentuk koloni bakteri simbion yang diperoleh pada sampel SFTLS4.

Tabel 4. Hasil pengamatan morfologi isolat bakteri (B1-B4) dari karang *S. polydactyla*.

Morfologi isolat	Isolat bakteri			
	B1	B2	B3	B4
Makroskopis koloni	<i>Circular, entire, convex, unpigmented, translucent.</i>	<i>Circular, entire, convex, unpigmented, translucent.</i>	<i>Circular, entire, convex, unpigmented, translucent.</i>	<i>Circular, entire, convex, unpigmented, translucent.</i>
Mikroskopis sel	Sel berbentuk batang, Gram Negatif, Tidak menghasilkan endospora.	Sel berbentuk batang, Gram Negatif, Tidak menghasilkan endospora.	Sel berbentuk batang, Gram Negatif, Tidak menghasilkan endospora.	Sel berbentuk batang, Gram Negatif, Tidak menghasilkan endospora.
Motilitas	Motil	Motil	Motil	Motil

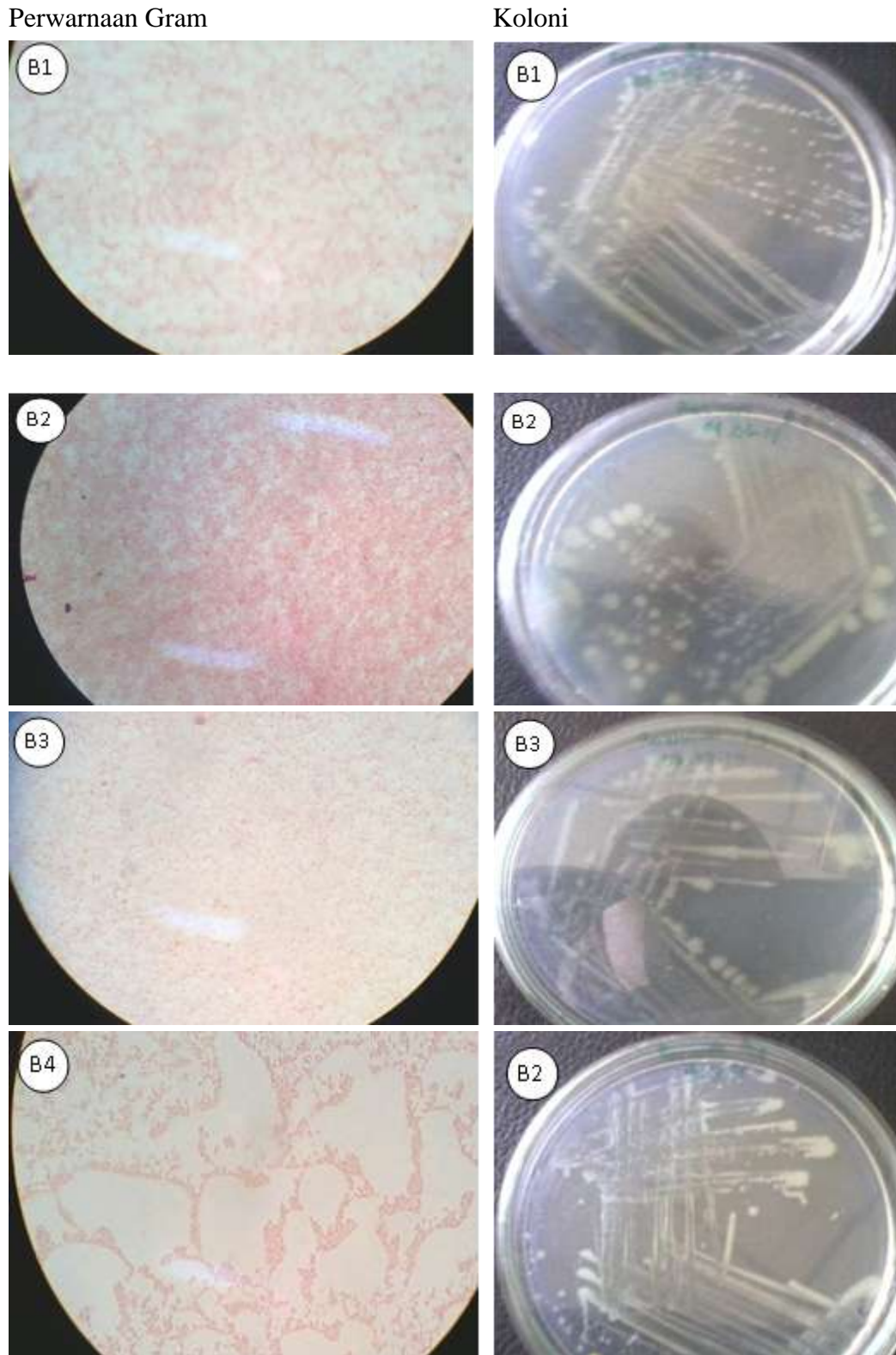
kan bahwa semua isolate menghasilkan warna merah, artinya bahwa isolat bakteri B1-B4 tersebut dikelompokkan pada bakteri gram negatif. Empat isolat bakteri B1-B4 menunjukkan karakteristik yang sama dengan isolat bakteri A1-A4 (Gambar 3). Hasil pengamatan uji biokimia pada kedelapan isolat bakteri simbion menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut dapat dikelompokkan menjadi empat spesies isolat bakteri simbion. Pada empat isolat bakteri karang lunak *S. flexibilis* diperoleh kesamaan hasil pada masing-masing dua isolat, dimana isolat A1 memiliki kesamaan dengan isolat A3, sedangkan isolat A2 memiliki kesamaan dengan A4, sehingga dari keempat isolat tersebut dapat dikelompokkan menjadi dua dimana diberi label A1 (isolat A1 & A3) sementara label A2 (isolat A2 dan A4). Untuk perbedaan isolat bakteri A1 dan A2 ditunjukkan pada uji biokimia, dimana ada perbedaan dari hasil uji hidrolisis pati, fermentasi glukosa dan sukrosa, uji metil merah, TSI, Simmon's sitrat dan Reduksi nitrat. Hasil identifikasi dari isolat bakteri pada karang lunak *S. flexibilis* dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri A1 adalah spesies *Pseudomonas diminuta* dan untuk isolat A2 adalah spesies *Edwardsiella hoshinae* (Tabel 5). Hasil uji biokimia pada keempat isolat bakteri simbion (B1-B4) pada *S. polydactyla* diperoleh kesamaan pada keseluruhan uji yang dilaku-

kan pada masing-masing isolat, dimana isolat B1 memiliki kesamaan dengan isolat B2 dan B3, Perbedaan isolat bakteri B1 dan B4 ditunjukkan pada uji biokimia, dimana ada perbedaan dari hasil uji hidrolisis pati, fermentasi glukosa dan sukrosa, uji metil merah, TSI, dan Simmon's sitrat. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat bakteri B1 diidentifikasi sebagai *Edward-siella hoshinae* dan isolat bakteri B4 adalah *Pseudomonas acidovorans* (Tabel 6).

3.1.2. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Isolat Bakteri

Hasil pengamatan aktivitas antibakteri pada isolat bakteri simbion ditemukan hanya isolat A1 memiliki zona hambat terhadap bakteri *B. subtilis*, *E. coli*, dan *S. dysentri*. Isolat B1 dan B4 ditemukan tidak memiliki zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri patogen, ini artinya hanya satu isolat bakteri yang berpotensi memiliki senyawa bioaktif sebagai antibakteri (Gambar 3).

Aktivitas antibakteri ekstrak A1 terhadap bakteri *B. subtilis* dengan zona hambat berkisar $10,16 \pm 0,3$ mm yang dikategorikan daya hambat kuat, sedangkan terhadap bakteri *S. dysentri* berkisar $9,86 \pm 1,7$ mm dan terhadap bakteri *E. coli* berkisar $8,66 \pm 0,8$ mm, keduanya dikategorikan daya hambat sedang. Ekstrak isolat B1 dan B4 ditemukan tidak memiliki aktivitas antibakteri (Tabel 7).



Gambar 2. Pewarnaan gram dan bentuk koloni bakteri simion yang diperoleh pada sampel SPTLS2.

Tabel 5. Hasil uji biokimia isolat bakteri simbion pada sampel karang SFTLS4.

Uji biokimia	Isolat Bakteri			
	A1	A2	A3	A4
Hidrolisis pati	-	+	-	+
Hidrolisis lemak	-	-	-	-
Hidrolisis kasein	-	-	-	-
Hidrolisis gelatin	-	-	-	-
Fermentasi glukosa	-	+	-	+
Fermentasi sukrosa	-	+	-	+
Fermentasi laktosa	-	-	-	-
Produksi H ₂ S	-	-	-	-
Produksi indol	-	-	-	-
Produksi urease	-	-	-	-
Uji metil merah	-	+	-	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-
Uji TSI	-	+	-	+
Simmon's sitrat	+	-	+	-
Reduksi nitrat	-	+	-	+

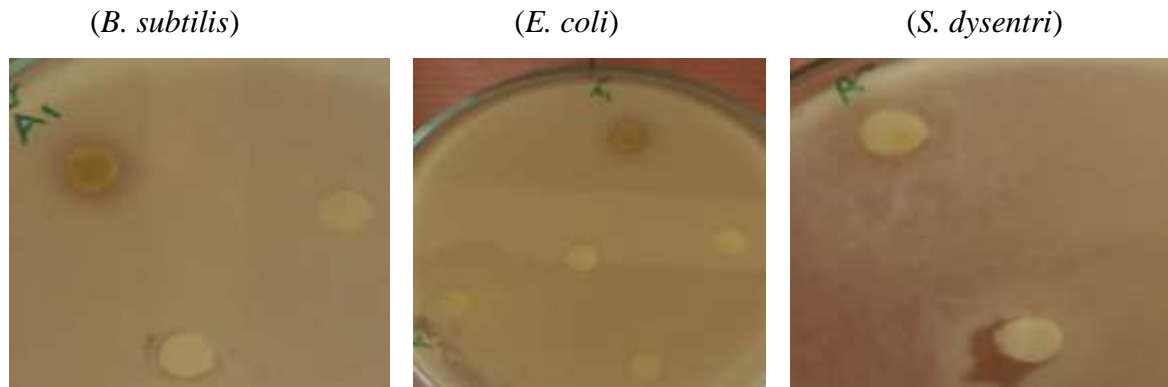
Tabel 6. Hasil uji biokimia isolat bakteri simbion pada sampel karang SPTLS2.

Uji biokimia	Isolat Bakteri			
	B1	B2	B3	B4
Hidrolisis pati	+	+	+	-
Hidrolisis lemak	-	-	-	-
Hidrolisis gelatin	-	-	-	-
Fermentasi glukosa	+	+	+	-
Fermentasi sukrosa	+	+	+	-
Fermentasi laktosa	-	-	-	-
Produksi H ₂ S	-	-	-	-
Produksi indol	-	-	-	-
Produksi urease	-	-	-	-
Uji metil merah	+	+	+	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-
Uji TSI	+	+	+	-
Simmon's sitrat	-	-	-	+
Reduksi nitrat	+	+	+	+

3.1.3. Kandungan Metabolit Sekunder Karang Lunak dan Simbion

Hasil analisis ini biasanya digunakan untuk mengetahui profil kandungan bahan kimia serta data spektrum MS masing-masing senyawa. Dari nilai *total ion current*

(TIC) dari ekstrak karang lunak *S. flexibilis* (SFTLS4) dan isolat bakteri simbion A1 terlihat memiliki puncak (*peak retention time* (Rt) yang sama yaitu Rt 15,25; 15,93; dan 20,19, sedangkan pada ekstrak isolat bakteri simbion A2 tidak ditemukan (Tabel 8).

Gambar 3. Aktivitas antibakteri isolat bakteri simbion dari *S. flexibilis* dan *S. polydactyla*.Tabel 7. Daya hambat ekstrak isolat bakteri simbion pada karang lunak *S. flexibilis* dan *S. polydactyla*.

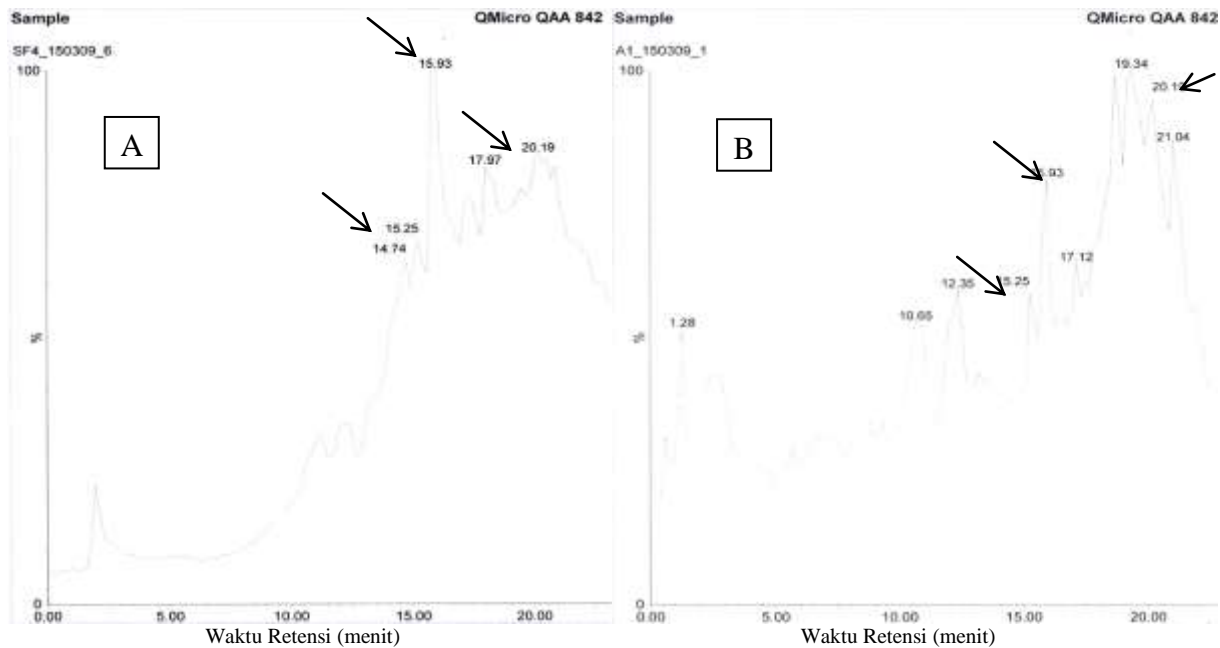
Isolat bakteri	Kode ekstrak	Spesies karang lunak	Zona hambat (mm)		
			<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. dysentri</i>
<i>P. diminuta</i>	A1	<i>S. flexibilis</i>	10.16±0.3	8.66±0.8	9.86±1.7
<i>E. hoshinae A</i>	A2	<i>S. flexibilis</i>	-	-	-
<i>E. hoshinae B</i>	B1	<i>S. polydactyla</i>	-	-	-
<i>P. acidovorans</i>	B4	<i>S. polydactyla</i>	-	-	-

Tabel 8. Data *total ion current* (TIC) dari nilai *m/z* ekstrak karang lunak *S. flexibilis* dan isolat bakteri simbion.

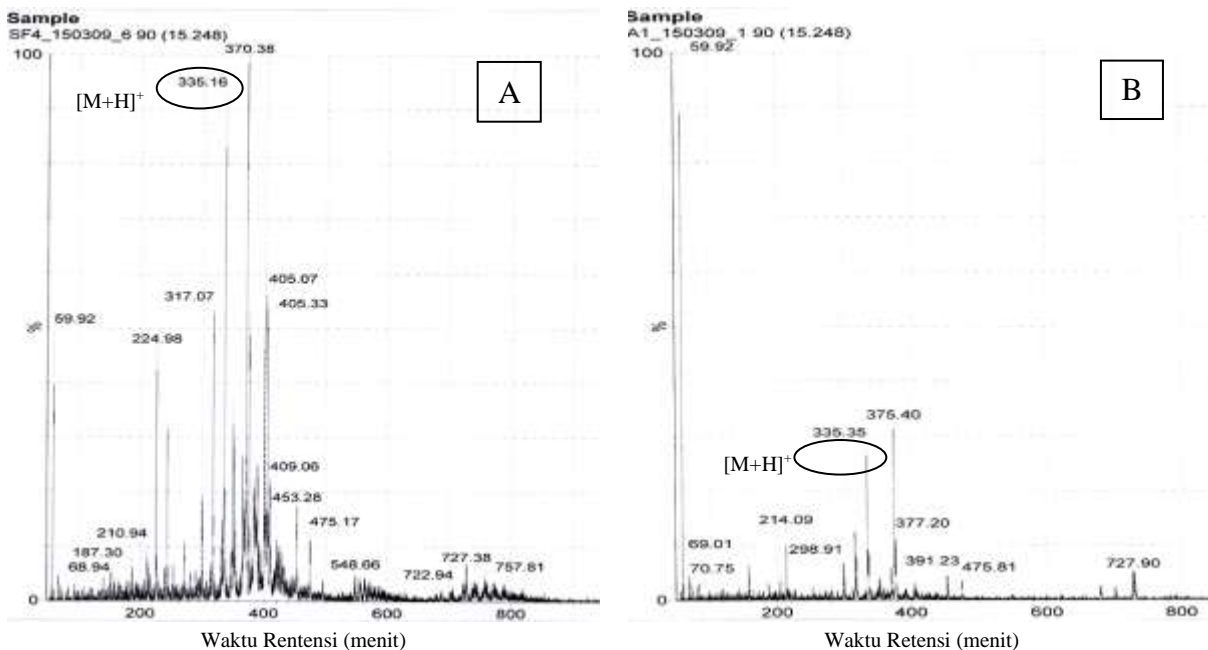
SFTLS4	<i>m/z</i>	Simbion A1	<i>m/z</i>	Simbion A2	<i>m/z</i>
1,9	-	1,27	-	-	-
11,16	-	10,65	210	11,33	210
12,18	-	12,35	244	12,86	244
14,74	-	15,25	334	16,44	339
15,25	334	15,93	339	17,63	339
15,93	364	17,12	452	19,67	452
17,29	345	18,66	-	-	-
17,97	364	19,34	212	-	-
20,19	-	20,19	-	-	-

Berdasarkan spektrum MS TIC kedua sampel menunjukkan bahwa ada tiga nilai *Rt* (15,25; 15,93; dan 20,19) yang sama dengan membentuk pola spektrum MS yang berbeda.

Sampel SFTLS4 menunjukkan *peak* tertinggi pada *Rt* 15,93; 20,19; dan 15,25. Sampel A1 *peak* tertinggi ditunjukkan pada *Rt* 20,19; 15,93; dan 15,25 (Gambar 4).



Gambar 4. Spektrum TIC senyawa yang sama, A) *S. flexibilis* (SFTLS4); dan B) Isolat simbion A1.



Gambar 5. Spektrum senyawa aktif, A) spesies *S. flexibilis* (SFTLS4); dan B) isolat bakteri simbion A1.

Berdasarkan hasil spektrum MS menunjukkan bahwa puncak dengan Rt 335 memiliki spektrum yang sama dengan bobot molekul senyawa 334 ($m/z = 335$ M+H) (Gambar 5). Senyawa ini diduga merupakan

senyawa aktif golongan diterpen Sinularin yang dikandung oleh Genus *Sinularia*. Profil yang sama juga terlihat dari hasil spektrum senyawa dari isolat bakteri simbion A1, yang menunjukkan bahwa senyawa aktif diterpen

Sinularin juga dihasilkan oleh isolat bakteri simbion A1.

3.2. Pembahasan

Pada karang lunak *S. flexibilis* berhasil didapatkan dua spesies bakteri simbion, yaitu *Pseudomonas diminuta* (A1) dan *Edwardsiella hoshinae* (A2). Pada karang lunak *S. polydactyla* berhasil diidentifikasi dua spesies bakteri *E. hoshinae* (B1) dan *P. acidovorans* (B4). Bakteri simbion yang berhasil diisolasi tersebut pernah dilaporkan oleh Radjasa *et al.*, (2007), yang juga menemukan bakteri *Pseudomonas* sp dari karang lunak *S. polydactyla*.

Keempat isolat bakteri yang diperoleh dikelompokkan bakteri gram negatif, berbentuk batang dan tidak menghasilkan endospora. Ada satu isolat bakteri simbion dari *S. flexibilis* diketahui berpotensi produksi senyawa bioaktif. Chelossi *et al.* (2004), lima strain bakteri dari spons *Petrosia ficiformis* diinduksi penghambatan satu atau lebih strain indikator (patogen). Dua strain yang diperoleh dari spesimen spons yang sama (E1 dan L9) menghasilkan senyawa antibiotik yang aktif terhadap bakteri *S. aureus* dan bakteri gram positif lainnya. Isolat bakteri simbion pada *S. polydactyla* tidak memiliki daya hambat antibakteri baik pada spesies *E. hoshinae* maupun *P. acidovorans*.

Kemampuan aktivitas antibakteri yang ditunjukkan ekstrak isolat bakteri *P. diminuta* (A1) terhadap bakteri patogen *B. subtilis* dengan kategori kuat, sedangkan *E. coli* dan *S. dysentri* dengan kategori sedang. Isolat bakteri pada *Sinularia* sp yang diambil dari Laut Jawa juga diperoleh dua isolat yang memiliki potensi aktivitas antibakteri yang identik dengan *Pseudovibrio* sp (99%) dan *Alpha proteobacterium* (81%) (Sulistiyani *et al.*, 2010). Isolat bakteri dari *Nephtheidae* sp dan *Sarcophyton* sp yang dikultur tidak menunjukkan aktivitas antibakteri, begitu juga dengan sampel *Sinularia* sp yang diambil dari lapangan (Chen *et al.*, 2012).

Senyawa aktif isolat bakteri dari *S. flexibilis* dari perairan P. Tegal menunjukkan

aktivitas antibakteri yang lebih kuat dibandingkan dengan yang dari bakteri simbion pada spons *Hymeniacidon perleve* (Zheng *et al.*, 2005), dan yang dari isolat bakteri pada empat jenis spons (*Echinodictyum* sp., *Spongia* sp., *Sigmadocia fibulatus* dan *Mycale mannarensis*) (Anand *et al.*, 2006). Shnit-Orland and Kushmaro (2008) menemukan senyawa aktif isolat bakteri dari mucus karang keras yang memiliki aktivitas antibiotik lebih banyak dibandingkan dengan senyawa aktif isolat bakteri karang lunak. Distribusi daya hambat sebagai antibakteri dari senyawa bakteri simbion pada karang lunak ditemukan bahwa 21,21% aktivitas penghambatan terhadap bakteri gram positif (*S. aureus*), 92,42% menghambat bakteri gram negatif (*E. coli*, *V. parahaemolyticus* dan *V. shilonii*), dan 13,64 % menghambat kedua-dua bakteri gram positif dan gram negatif (Chen *et al.*, 2012).

Hasil analisis LCMS dari senyawa aktif karang lunak menunjukkan senyawa aktif golongan diterpen Sinularin. Senyawa aktif tersebut dihasilkan juga oleh bakteri simbion. Aktivitas antibakteri dari senyawa aktif bakteri simbion pada karang lunak juga pernah dilaporkan oleh Radjasa *et al.*, (2007).

Senyawa aktif yang dikandung *S. flexibilis* dengan berat molekul 334 adalah senyawa dari golongan diterpen Sinularin. Hal ini telah dilaporkan oleh Tursch *et al.* (1975) yang menemukan senyawa aktif Sinulariolide dari *S. flexibilis*. Senyawa dengan berat molekul yang sama dengan Sinularin (I) juga ditemukan pada karang lunak *S. flexibilis* (Weinheimer *et al.*, 1977). Senyawa diterpen lainnya seperti Flexilarin dilaporkan diproduksi juga oleh *S. flexibilis* (Lin *et al.*, 2009). Senyawa sinuladiterpenes A–F (Lo *et al.*, 2009). Senyawa Flexibilisolides, Flexibilisin dan 11,12-Secoflexibillin (Shih *et al.*, 2012).

Genus *Sinularia* merupakan salah satu karang lunak yang paling menyebar dan banyak ditemukan mengandung senyawa bioaktif. *Sinularia* sp dari Taman Laut Bunaken diperoleh senyawa diterpen Sinularioside

(Putra *et al.*, 2012). Sinulanor cembranolide A (1) diproduksi karang lunak *S. gaweli* (Yen *et al.*, 2013). Sesquiterpen capillosananes S–Z (1–8) diproduksi *S. capillosa* (Chen *et al.*, 2014). Norcembran sinugyrosanolide dihasilkan *S. gyrosa* (Cheng *et al.*, 2014). Senyawa diterpen Numerosol A–D (1–4) diperoleh pada *S. numerosa* dari perairan Taiwan (Tseng *et al.*, 2014). Senyawa Sinulolides A–H (1–8) berhasil diisolat dari spesies *Sinularia* sp (Yang *et al.*, 2014). Senyawa 5-Episinuleptolide (1) dan 4 α -Hydroxy-5-episinuleptolide (2) diperoleh dari spesies *S. numerosa* (Chen *et al.*, 2015).

KESIMPULAN

Dari kedua sampel karang lunak berhasil diperoleh empat isolat bakteri simbion, yaitu dua isolat bakteri *P. diminuta* (A1) dan *E. hoshinae* (A2) dari spesies *S. flexibilis*, serta dua isolat bakteri *Edward-siella hoshinae* (B1) dan *P. acidovorans* (B4) dari spesies *S. polydactyla*.

Potensi senyawa bioaktif sebagai antibakteri ditunjukkan hanya pada isolat bakteri simbion *P. diminuta* (A1) dari spesies *S. flexibilis*, sedangkan senyawa isolat bakteri simbion dari karang lunak *S. polydactyla* ditemukan tidak ada aktivitas antibakteri. Kandungan senyawa bioaktif isolat bakteri simbion *P. diminuta* (A1) diketahui kelompok diterpen sinularin yang sama dengan senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh karang lunak *S. flexibilis*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari DIPA Sains Teknologi dan Seni (Sateks) Universitas Sriwijaya dengan Nomor 042.04.2.400089/2015. Terima kasih kami ucapkan kepada Kepala Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi dan Laboratorium Biologi Laut Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya yang telah meminjamkan peralatan-peralatan seperti peralatan

isolasi bakteri dan peralatan selam SCUBA, kulturisasi hingga ekstraksi sampel. Terima kasih juga kepada Kepala Laboratorium LABTIAP BPPT Serpong dan Lab Kesda DKI Jakarta yang telah membantu dalam proses isolasi kandungan senyawa aktif.

DAFTAR PUSTAKA

- Anand, T.P., A.W. Bhat, Y.S. Shouche, U. Roy, J. Siddharth, and S.P. Sarma. 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research*, 161(3):252-262.
- Arafat, D. 2009. Pertumbuhan karang lunak (Octocorallia: Alcyonacea) *Lobophytum strictum*, *Sinularia dura* dan perkembangan gonad *Sinularia dura* hasil fragmentasi buatan di Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu. Tesis. Institut Pertanian Bogor. 82hlm.
- Atlas, R.M. 2005. Handbook of Media for Environmental Microbiology. 2nd ed. Taylor & Francis. London. 664p.
- Benson, H.J. 2002. Microbiological applications a laboratory manual in general microbiology. 8th ed. McGraw Hill. Boston. 478p.
- Cappucino, J.G., and N. Sherman. 2008. Microbiology a laboratory manual. 8th ed. Benjamin Publish. New York. 544p.
- Chelossi, E., M. Milanese, A. Milano, R. Pronzato, and G. Riccardi. 2004. Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae). *J. Experimental Marine Biology and Ecology*, 309 (1):21-33.
- Chen, D., W. Cheng, D. Liu, L. van Ofwegen, P. Proksch, and W. Lin. 2014. Capillosananes S-Z, new sesquiterpenoids from the soft coral *Sinularia capillosa*. *Tetrahedron Letters*, 55(19):3077-3082.

- Chen, W.F., C.T. Yin, C.H. Cheng, M.C. Lu, L.S. Fang, W.H. Wang, Z.H. Wen, J.J. Chen, Y.C. Wu, and P.J. Sung. 2015. Norcembranoidal diterpenes from the cultured-type octocoral *Sinularia numerosa*. *Int J Mol Sci.*, 16(2):3298-3306.
- Chen, Y.H., J. Kuo, P.J. Sung, Y.C. Chang, M.C. Lu, T.Y. Wong, J.K. Liu, C.F. Weng, W.H. Twan, and F.W. Kuo. 2012. Isolation of marine bacteria with antimicrobial activities from cultured and field-collected soft corals. *World J. Microbiol Biotechnol.*, 28 (12):3269-3279.
- Cheng, S.Y., N.L. Shih, C.T. Chuang, S.F. Chiou, C.N. Yang, S.K. Wang, and C.Y. Duh. 2014. Sinugyrosanolide A, an unprecedented C-4 norcembranoid, from the Formosan soft coral *Sinularia gyrosa*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 24(6):1562-1564.
- Collins, H.C., Lyne, and M. Patricia. 1985. *Microbiological Methods*. 5th ed. Butterworths. London. 456p.
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi dasar dalam praktek: teknik dan prosedur dasar laboratorium*. Gramedia Pustaka. Jakarta. 163hlm
- Kelman, D., A. Kushmar, Y. Loya, Y. Kashman, and Y. Benayahu. 1998. Antimicrobial activity of a Red Sea soft coral, *Parerythropodium fulvum fulvum*: reproductive and developmental considerations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 169:87-95.
- Lay, B.W. 1994. *Analisis mikroba di laboratorium*. Raja Grafindo Persada. Jakarta. 168hlm.
- Lin, Y.S., C.H. Chen, C.C. Liaw, Y.C. Chen, Y.H. Kuo, and Y.C. Shen. 2009. Cembrane diterpenoids from the Taiwanese soft coral *Sinularia flexibilis*. *Tetrahedron*, 65(45):9157-9164.
- Lo, K.L., A.T. Khalil, Y.H. Kuo, and Y.C. Shen. 2009. Sinuladiterpenes A-F, new cembrane diterpenes from *Sinularia flexibilis*. *Chem Biodivers*, 6(12): 2227-2235.
- Margeretha, I. 2012. *Kajian senyawa bioaktif propolis Trigona spp. sebagai agen antikaries melalui pendekatan analisis kimia dipandu dengan bioassay*. Disertasi. Universitas Indonesia. 203hlm.
- Putra, M.Y., A. Ianaro, E. Panza, G. Bavestrello, C. Cerrano, E. Fattorusso, and O. Taglialatela-Scafati. 2012. Sinularioside, a triacetylated glycolipid from the Indonesian soft coral *Sinularia* sp., is an inhibitor of NO release. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(8):2723-2725.
- Radjasa, O.K., S.I.O. Salasia, A. Sabdono, J. Weise, J.F. Imhoff, C. Lammler, and M.J. Risk. 2007. Antibacterial activity of marine bacterium *Pseudomonas* sp associated with soft coral *Sinularia polydactyla* and against *Streptococcus equi* Subsp. *zooepidemicus*. *Int. J. of pharmacology*, 3(2):170-174.
- Shih, H.J., Y.J. Tseng, C.Y. Huang, Z.H. Wen, C.F. Dai, and J.H. Sheu. 2012. Cytotoxic and anti-inflammatory diterpenoids from the Dongsha Atoll soft coral *Sinularia flexibilis*. *Tetrahedron*, 68(1):244-249.
- Shnit-Orland, M., and A. Kushmaro. 2008. Coral mucus bacteria as a source for antibacterial activity. *Proceedings of 11th International Coral Reef Symposium*, Ft. Lauderdale. Florida, 7-9 July 2008. 257-259pp.
- Sulistiyani, S.A. Nugraheni, O.K. Radjasa, A. Sabdono, and M.M. Khoeri. 2010. Antibacterial activities of bacterial symbionts of soft coral *Sinularia* sp. against Tuberculosis bacteria. *J. Coastal Development*, 14(1):45-50.
- Tseng, Y.J., Y.C. Yang, S.K. Wang, and C.Y. Duh. 2014. Numerosol A–D, new cembranoid diterpenes from the soft coral *Sinularia numerosa*. *Marine Drugs*, 12(6):3371-3380.

- Tursch, B., J.C. Braekman, D. Daloz, M. Herin, R. Karlsson, and D. Losman. 1975. Chemical studies of marine invertebrates-XI: Sinulariolide, a new cembranolide diterpene from the soft coral *Sinularia flexibilis* (coelenterata, octocorallia, alcyonacea). *Tetrahedron*, 31(2):129-133.
- Weinheimer, A.J., J.A. Matson, M.B. Hossain, and D. van der Helm. 1977. Marine anticancer agents: sinularin and dihydrosinularin, new cembranolides from the soft coral, *Sinularia flexibilis*. *Tetrahedron Letters*, 18(34): 2923-2926.
- Yang, B., X. Wei, J. Huang, X. Lin, J. Liu, S. Liao, J. Wang, X. Zhou, L. Wang, and Y. Liu. 2014. Sinulolides A-H, new cyclopentenone and butenolide derivatives from soft coral *Sinularia* sp. *Marine drugs*, 12(10):5316-5327.
- Yen, W.H., Y.D. Su, Y.C. Chang, Y.H. Chen, Y.H. Chen, C.F. Dai, Z.H. Wen, J.H. Su, and P.J. Sung. 2013. Sinulanorcembranolid A, a novel norcembranoidal diterpene from the octocoral *Sinularia gaweli*. *Tetrahedron Letters*, 54(18):2267-2270.
- Zheng, L., H. Chen, X. Han, W. Lin, and X. Yan. 2005. Antimicrobial screening and active compound isolation from marine bacterium NJ6-3-1 associated with the sponge *Hymeniacidon perleve*. *W. J. Microbiology and Biotechnology*, 21:201-206.
- Diterima* : 9 September 2015
Direview : 6 Oktober 2015
Disetujui : 15 Desember 2015