

KEMAMPUAN METABOLIT SEKUNDER BAKTERI LAUT MENGHAMBAT PERTUMBUHAN *Vibrio parahaemolyticus* DAN *Staphylococcus aureus*.

Widiastuti, HN.^{*)}

ABSTRACT

This study is to find out the ability of the secondary metabolites of the marine bacterias to inhibit *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus*.

Water samples were taken from Jepara Coast. The samples were analyzed for the presence of Marine bacterias by isolation and identification. Sensitivity of the marine bacterias to inhibit the growth of *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus* was characterized by incubation for 24, 48 and 72 hr at the paper disks surrounded by media inoculated with *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. Sensitivity was indicated by the diameter of inhibition zone formed during incubation.

Results indicated that the coastal water contained *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Flavobacterium sp.* and *Nocardia sp.* which produced secondary metabolites that inhibited the growth of *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus* in 48 hours incubation.

Key words: Secondary metabolites, Marine bacteria, pathogen bacteria (*Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus*)

PENDAHULUAN

Metabolit sekunder merupakan suatu senyawa yang dihasilkan oleh organisme tertentu yang secara umum tidak berfungsi didalam proses kehidupan, tetapi penting sebagai pelindung dirinya terhadap serangan organisme lain. Menurut Fenny (1976) dalam Sunaryono (1994) menyatakan, bahwa metabolit sekunder merupakan senyawa hasil sintesis suatu organisme bukan untuk mempertahankan eksistensinya terhadap lingkungan, tetapi menurut Mannito (1981) bahwa sejumlah kecil metabolit yang dihasilkan sangat berperan bagi kelangsungan hidupkan untuk mempertahankan diri dari predator atau organisme lain.

Secara umum metabolit dapat diklasifikasikan menjadi suatu antibiotik, inhibitor enzim, toksin tumbuhan, zat pengatur tumbuh, hormon mikroba dan insektisida. Menurut Brock dan Madigan (1991) bahwa antibiotik merupakan hasil metabolit sekunder yang pada kadar rendah dapat berfungsi sebagai zat penghambat pertumbuhan mikroba. Gunawan dkk (1982) menyatakan, bahwa antibiotik adalah bahan organik yang berasal dari mikroba yang dapat bersifat sebagai racun ataupun dapat menghambat pertumbuhan organisme lain. Selanjutnya Wilson dan Gisvold (1982) bahwa antibiotik merupakan senyawa kimia yang diproduksi oleh

organisme hidup yang pada kadar rendah dapat menghambat proses kehidupan mikroorganisme lain. Menurut Rosenfeld dan ZoBell dalam Austin (1988) menyatakan bahwa bakteri laut adalah suatu organisme laut sebagai penghasil antibiotik.

Berdasarkan aktivitas kerjanya antibiotik mempunyai dua fungsi (Lay dan Hastowo, 1992) yaitu sebagai bakteriostatik yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri dan bakterisida yang bersifat membunuh bakteri.

Bakteri laut dapat hidup dan toleran terhadap salinitas tinggi atau bersifat halofilik dan juga termasuk golongan bakteri heterotrofik dan halotoleran karena bakteri tersebut berasal dari darat yang mampu hidup di lingkungan laut (Rheinheimer, 1992). Morfologi bakteri laut adalah 95% bersifat gram negatif, hidup pada suhu mesofilik yaitu 20° - 40°C, tetapi toleran sampai suhu 80°C, bersifat aktif atau motil, bentuk koloni sangat kecil dan pertumbuhannya lambat (Austin, 1988). Bakteri laut hidup tersebar luas yang bermula dari permukaan laut sampai dasar laut baik yang berada di dalam air maupun dalam lumpur sedimen dan spesies bakteri laut yang dominan di laut antara lain *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Bacterium* dan *Actinomycetes* (ZoBell, 1990). Menurut Moebus (1972) dalam Rheinheimer (1992), bahwa bakteri patogen yang ada di laut meliputi bakteri *Salmonella typhi*, *Vibrio comma*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.* dan lain-lain.

TUJUAN PENELITIAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi metabolit sekunder bakteri laut dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus* yang pada pengembangannya diharapkan dapat dimanfaatkan dalam bidang Industri makanan maupun industri farmasi serta mengetahui pengaruh waktu inkubasi terhadap efektifitas metabolit sekunder dari bakteri laut.

METODA PENELITIAN

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian adalah air laut, isolat murni bakteri laut dan bakteri uji *Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus* yang diambil dari Balai Budidaya Air Payau Jepara. Cara mendapatkan isolat murni yaitu dengan mengambil air laut sebanyak 10 ml diencerkan sampai menjadi 10⁻³, kemudian ambil 10 ml larutan tersebut dituang dalam media Zobell 2216 E secara Pour Plate dan diinkubasikan pada suhu 30°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh

^{*)} Widiastuti HN., Staf Pengajar Program Studi Teknik Lingkungan FT-UNDIP

dipisahkan yaitu dengan mengambil 1-2 ose koloni tersebut digoreskan pada media Zobell 2216 E dan diinkubasikan pada suhu 30°C selama 24 jam, pemisahan koloni dilanjutkan sampai didapat kultur murni pada permukaan agar atau baik bentuk dan warna koloni sudah sama dalam satu cawan petri. Kultur murni yang didapat dipindahkan sebanyak satu ose dengan cara digoreskan ke dalam media Nutrien Agar miring. Stok kultur tersebut yang digunakan untuk uji metabolit sekunder.

Materi penunjang berupa peralatan dan baham kimia untuk analisis mikrobiologi yaitu Nutrien Agar miring, Mueller Hinton Broth, TCBS agar, media Zobell 2216 E.

Metoda

Pada penelitian ini dilakukan persiapan sampel, media uji bakteri laut yang dilanjutkan dengan isolasi dan penentuan kultur dengan menggunakan metode goresan langsung pada media ZoBell 2216 E (Lay, 1994). Selanjutnya dilakukan uji pertumbuhan bakteri dengan meneteskan media nutrien broth yang berisi kultur bakteri laut di atas paper disk, kemudian identitas bakteri laut dilakukan dengan metoda Cowan (1980). Sedang uji sensitivitas bakteri laut dengan metoda difusi agar menurut Kirby-Bauer (Nirnama, 1987 ; Concepcion, 1994).

Metoda yang digunakan penelitian ini adalah eksperimental dengan Rancangan Petak Terpisah dengan dasar Rancangan Acak Lengkap (RAL). Untuk perlakuan utama adalah waktu inkubasi yaitu selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam yang berdasarkan pertumbuhan bakteri laut 1-7 hari, sedangkan sub perlakuan adalah jenis bakteri laut dan sebagai kelompok adalah jenis bakteri uji (*Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus*) dengan tiga kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Isolasi dan identifikasi Bakteri laut

Bakteri laut yang telah berhasil diisolasi dengan menggunakan agar miring media ZoBell 2216 E, kemudian dilakukan identifikasi bakteri. Hasil penelitian menunjukkan, bahwa dari 80 isolat isolat bakteri laut yang dominan di dapatkan 4 macam bakteri yaitu bakteri *Pseudomonas spp*, *Bacillus sp.*, *Flavobacterium sp.* dan *Nocardia sp.* (tabel 1).

Tabel 1. Isolation and identification of marine bacteria species from Jepara coastal waters

No.	Species of marine bacteria	Gram
1.	<i>Pseudomonas spp</i>	-
2.	<i>Bacillus sp.</i>	+
3.	<i>Flavobacterium sp.</i>	-
4.	<i>Nocardia sp.</i>	-

Hal ini disebabkan bakteri tersebut hidup di perairan laut tropis yang kondisinya dan faktor lingkungannya cocok untuk keempat genera bakteri tersebut, sehingga bakteri tersebut sering dikenal dengan bakteri heterotrof dan halotoleran (Rheinheimer, 1980). Selain itu limbah yang ada di perairan Jepara sangat

memungkinkan terdapat limbah organik cair dan padat yang memungkinkan bakteri laut dapat hidup dan toleran terhadap lingkungan laut tropis atau pada suhu antara 20 ° - 40° C tetapi toleran sampai suhu 80°C (Austin, 1988). Bakteri laut hidup tersebar luas mulai dari permukaan laut sampai dasar laut, baik yang berada di dalam air maupun di dalam lumpur sedimen. Genera bakteri laut yang dominan di laut antara lain *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Bacillus* dan *Actinomyces* (ZoBell, 1990). Menurut Starr dkk (1981), jenis *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Spirillum* dan *Flavobacterium* maupun *Bacillus* terdapat di sedimen dan tersebar luas di laut. Menurut Hoppe (1986) dalam Ruyitno (1988) lautan berdasarkan sifat-sifat ekologis dan biokimianya dikelompokkan menjadi empat zona yaitu zona neustonik, zona eupotik, zona apotik dan zona dasar laut yang keberadaan bakteri laut sangat tergantung pada sifat-sifat dan faktor lingkungan yang lain.

2. Pertumbuhan Bakteri laut Pada Paper Disk

Berdasarkan Uji Pertumbuhan bakteri laut pada paper disk yang telah dilakukan, terlihat bahwa bakteri laut mampu hidup melalui paper disk atau menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri disekeliling paper disk (Gambar 1 dan 2).

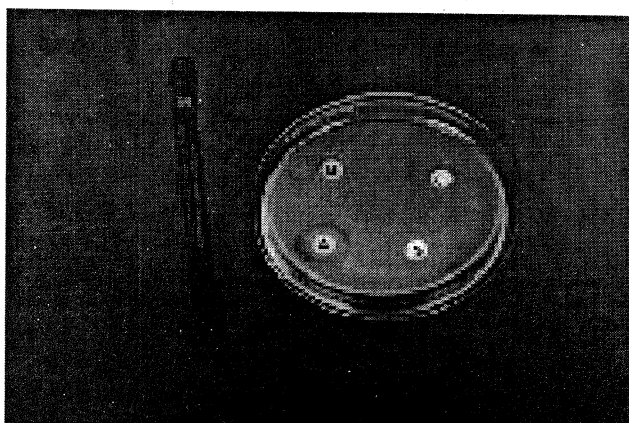


Figure 1. Inhibition zone of marine bacteria in ZoBell 2216 E media through disk paper on *Vibrio parahaemolyticus* : (A) *Pseudomonas spp*, (B) *Bacillus sp.*, (C) *Nocardia sp.*, (D) *Flavobacterium sp.*

Dari uji pertumbuhan bakteri laut tersebut dapat terlihat disekeliling paper disk dengan membentuk lingkaran atau cincin-cincin hambatan (Gambar 1 & 2), hal ini disebabkan karena media Nutrien Agar Broth berdifusi ke luar dari paper disk ke dalam media agar, sehingga bakteri tersebut dapat tumbuh pada media agar padat. Selain itu media agar ZoBell 2216 E mengandung nutrisi yang dibutuhkan untuk perkembangan hidup bakteri yaitu terdiri dari pepton yang merupakan sumber utama nitrogen organik dan sedikit vitamin, yeast ekstrak merupakan sumber vitamin B dan senyawa karbon, agar bukan merupakan nutrisi tetapi berfungsi sebagai bahan solidifikasi media dan ferrifosfat sebagai sumber mineral

dan protein. Menurut Judoamidjojo (1989), bahwa bakteri memerlukan nutrisi untuk kehidupan dan pertumbuhannya.

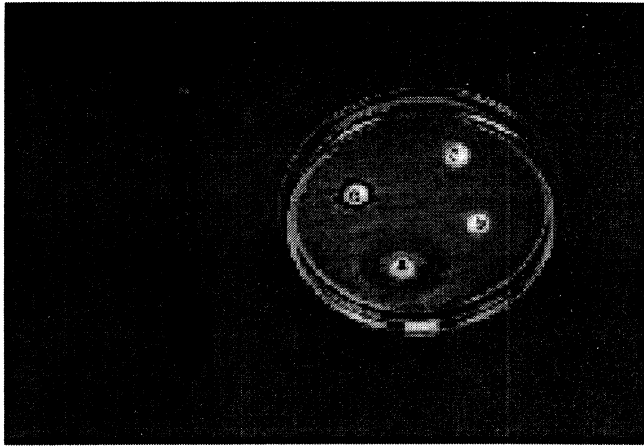


Figure 2. Inhibition zone of marine bacteria in ZoBell 2216 E media through disk Paper on *Staphylococcus aureus* : (A) *Pseudomonas spp.*, (B) *Bacillus sp.*, (C) *Nocardia sp.*, (D) *Flavobacterium sp.*

3. Sensivitas Bakteri

Pengamatan hasil uji sensitivitas bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan mengukur diameter daerah jernih di sekitar paper disk yang merupakan zona hambatan pertumbuhan bakteri akibat adanya bakteri yang diisolasi dari air laut (Tabel 2)

Berdasarkan hasil pengamatan (Tabel 2, gambar 1 & 2,) diketahui bahwa keempat bakteri tersebut menghasilkan metabolit sekunder yang berperan sebagai penghambat pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus* yaitu dengan adanya pertumbuhan disekeliling paper disk, yang kemudian zona hambatan tersebut diukur diameternya. Hal ini berarti metabolit sekunder yang dihasilkan oleh keempat bakteri laut tersebut merupakan suatu senyawa anti mikroba yaitu senyawa kimia yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan fungsi membran sel menghambat sintesis protein dan sintesis asam nukleat pada mikroba (Lay dan Hastowo, 1992). Manitto (1981), menyatakan bahwa metabolit sekunder adalah suatu senyawa yang digunakan untuk mempertahankan diri dari organisme lain. Sedangkan Russel (1983), bahwa mikroorganisme yang dapat mengeluarkan metabolit sekunder diantaranya adalah bakteri.

Diameter zona hambatan yang dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas sp* lebih besar dibandingkan dengan bakteri *Bacillus sp*, *Flavobacterium sp* dan *Nocardia sp* baik terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus* (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa daya kerja metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *Pseudomonas sp* lebih toksik terhadap bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus* yaitu dapat menghambat sintesis protein dan mencegah penyusunan dinding sel (Prentis, 1990).

Pada perbandingan hasil pembentukan diameter zona hambatan bakteri uji antara *V. parahaemolyticus* dan *S. aureus*, menunjukkan perbedaan sangat nyata (Tabel 2). Ini disebabkan karena masing-masing bakteri uji mempunyai sifat yang berbeda, *Vibrio parahaemolyticus* bersifat gram negatif dan *S. taphylococcus aureus* bersifat gram positif. Menurut Lay dan Hastowo (1992), bakteri gram negatif mempunyai struktur yang berbeda dengan bakteri gram positif. Pelczar dan Chan (1986), bahwa bakteri gram negatif mengandung lipid, lemak atau substansi seperti lemak lebih tinggi dibandingkan bakteri gram positif atau struktur dinding sel bakteri gram negatif lebih tipis dibandingkan dengan dinding sel bakteri gram positif. Dengan adanya penyerangan terhadap metabolit sekunder lipid akan terekstraksi sehingga memperbesar daya permeabilitas dinding sel negatif.

Tabel 2. The result of inhibition zone diameter measurement on *Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus* bacteria growth

Incubation time	Treatment Species of bacteria	Inhibition zone diameter (nm)	
		<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
24 hr	<i>Pseudomonas spp</i>	20,64	30,42
	<i>Bacillus sp.</i>	9,75	10,12
	<i>Nocardia sp.</i>	8,90	9,40
	<i>Flavobacterium sp</i>	9,60	8,97
48 hr	<i>Pseudomonas spp</i>	20,73	30,52
	<i>Bacillus sp.</i>	10,45	10,60
	<i>Nocardia sp.</i>	18,25	10,35
	<i>Flavobacterium sp.</i>	9,15	9,40
72 hr	<i>Pseudomonas spp</i>	20,72	30,32
	<i>Bacillus sp.</i>	10,47	10,62
	<i>Nocardia sp.</i>	10,32	10,36
	<i>Flavobacterium sp.</i>	9,52	9,40

Dari hasil uji pengukuran diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri uji *Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa ke-4 isolat bakteri laut tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji yang berbeda satu sama lain dengan perlakuan waktu inkubasi (Tabel 2).

Pada (Tabel 2) perlakuan waktu inkubasi terhadap pembentukan diameter zona hambatan bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus* dengan melalui uji Duncan pada perlakuan waktu inkubasi 24 jam memberikan pengaruh sangat berbeda sangat nyata dari waktu inkubasi 48 jam dan 72 jam, sedangkan waktu inkubasi 48 jam tidak berbeda dengan yang 72 jam dengan harga F hitung > F tabel 1% dan 5%. Hal ini disebabkan karena pada inkubasi 48 jam menghasilkan pertumbuhan maksimal dan setelah inkubasi diperpanjang sampai 72 jam terjadi penurunan daya kerja toksin. Selanjutnya waktu inkubasi sesudah lebih dari 72 jam terjadi kematian sel, berarti racun yang dikeluarkanpun banyak berkurang atau hanya sedikit, sehingga racun tidak mampu atau tidak efisien lagi menghambat pertumbuhan bakteri uji. Setyati (1996) menyatakan bahwa banyaknya racun yang dihasilkan bakteri laut berbanding lurus dengan kemampuan menghambat bakteri lain. Dwidjoseputro (1989), *Pseudomonas sp* menghasilkan suatu pigmen berwarna biru yang disebut piosianin yang merupakan

racun bagi beberapa spesies bakteri dan juga racun bagi beberapa hewan. *Pseudomonas sp.* juga menghasilkan sefaloporiin C yang menurut Prentis (1990), senyawa tersebut bersifat membunuh *Staphylococcus aureus* dengan cara mencegah bakteri untuk menyusun dinding sel secara normal.

Dilihat dari efektifitas dalam penghambatan pertumbuhan bakteri, maka bakteri *Pseudomonas spp.*, *Bacillus sp.*, *Nocardia sp.* dan *Flavobacterium sp.* mempunyai sifat Broad Spectrum Antibakteri, artinya senyawa yang dikeluarkan oleh keempat bakteri tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan bakteri gram negatif *Vibrio parahaemolyticus*. Tetapi apabila hanya menghambat salah satu kelompok bakteri saja yaitu gram negatif atau gram positif, maka bersifat Narrow Spektrum Antibakteri (Edmonds, 1978).

Sedang untuk jenis bakteri, terdapat perbedaan yang sangat nyata antara jenis bakteri *Pseudomonas spp.* dengan *Bacillus sp.*, *Nocardia sp.* dan *Flavobacterium sp.* Untuk masing-masing bakteri *Bacillus sp.*, *Nocardia sp.* dan *Flavobacterium sp.* tidak berbeda nyata (gambar 1& 2). Menurut Setyati (1996), perbedaan sensitivitas pada bakteri uji tersebut disebabkan karena metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antibakteri mempunyai perbedaan dalam menetralkan senyawa antibakteri.

KESIMPULAN

Bakteri laut yang mempunyai kemampuan menghasilkan metabolit sekunder akan mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus* adalah bakteri laut *Pseudomonas spp.*, *Bacillus sp.*, *Flavobacterium sp.* dan *Nocardia sp.*

Diameter zona hambatan merupakan hasil metabolit sekunder yang dihasilkan bakteri laut berupa senyawa antibakteri sebagai racun dan bersifat Broad Spectrum..

Metabolit sekunder yang dihasilkan *Pseudomonas spp.* adalah terbesar dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus*.

Waktu inkubasi dan jenis bakteri laut mempengaruhi pembentukan zona hambatan *Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada sdr. Hadi Wijayanto yang telah membantu peneliti dalam melakukan penyelesaian laporan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Austin, B., 1988. Marine Microbiology, First ed. Cambridge University Press. New York. USA.
Brock, T. D. and M. T. Madigan, 1991. Biology of Microorganisms. 6 th Prentice Hall Englewood Cliff. New Jersey. Pp. 361-362.

Concepcion G. P. ; P. W. Caraan dan J. E., Lazaro, 1994. Biological Assays for Screening of Marine Samples. In : Second Marine Natural Product Workshop. Marine Science Institute an Institute of Chemistry. University of the Philippines. Diliman, Quezon City. 15-18 hal.
Cowan and Steel, 1980. Manual for the Identification of Medical Bacterial. 3 th. Ed. Cambridge University Press. Cambridge. 45-105 hal.
Dwidjoseputro, D., 1989. Dasar-dasar Mikrobiologi. Ed.10. Djambatan Jakarta. 211 hal.
Edmonds, P., 1978. Microbiology An Enviromental Perspective. Macmillan Publishing Co. Inc. New York. 367 hal.
Gunawam, A.W.; S.R. Angka; K.O.Lioe; Hastowo; B. Lay., 1992. Dunia Mikroba. Penerbit Bhatara Karya Aksara. Jakarta. 127 hal.
Hanafiah, A. K., 1991. Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi. Rajawali Pers. Jakarta. 228 hal.
Judoamidjojo, R.M., 1989. Biokonversi. IPB Press. Pep. Pen & Keb. Dirk. Jend. Pend. Tinggi. PAU bioteknologi IPB. 58 hal.
Lay, B.W. dan S. Hastowo, 1992. Mikrobiologi. Ed 1. Radjawali Press. Jakarta. 28-92 hal.
Manitto, O., 1981. Biosintesis Produk Alami. IKIP Semarang Press. 597 hal.
Nirnama, 1987. Laporan Teknis Pemeriksaan Laboratorium Mikrobiologi. Puslakes. Depkes RI. Yogyakarta. 302 hal.
Pelczar, M.J. dan E.C.S. Chan, 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi. Cet. Jakarta. UI-Press. 1114-1118 hal. (Alih Bahasa : Hadioetomo, Imas J., Tjitrosomo).
Rheinheimer, G., 1980. Aquatic Microbiology . A Wiley Inter Science Publication. Chichester. Pp.225.
Rheinheimer, G., 1992. Aquatic Microbiology. Institute of Marine Science University of Kiel Germany. John Wiley & Sons. Pp. 31-37.
Ruyitno, 1988. Perhitungan Secara Langsung Bakteri Laut Menggunakan Teknik Mikroskop Epifluoresens. Oseana. Volume XIII. No. 1. 28-30 hal.
Setyati, W.A., 1996. Daya Antibakteri Asam Bongkrek Terhadap Bakteri *Echerichia Coli*, *Staphylococcus thypii*, *V. cholerae*. F. Biologi-Unsud. Purwokerto. 62 hal.
Starr, M.P., H. Stop; H.G. Troper; A. Balows and M.G. Schlegel , 1981. The Procarytes. A Handbook of habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Berlin. Heidelberg. New York: Springer. Pp. 2284.
Sunaryono, W., 1994. Fenomena Metabolit Sekunder Tanaman dan Pengembangan Fitomarka. Buletin Ristek Dewan Riset Nasional. 25-30 hal.
Wilson dan Gisvolg, 1982. Buku Teks Wilson dan Gisvolg Kimia Farmasi dan Medisinal Organik. Ed VII. IKIP. Semarang Press. Semarang. (Alih Bahasa : Mustofa Fath). 152 hal.
Zobell, C.E., 1990. Marine Microbiology. A new series of Plant Science Books. Vol . XVII. Published by Chronica Botanica Co.