

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MIKROBA SIMBION *SPONGE Axinella* sp.

Asadatun Abdullah*

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Axinella* sp. SPONGE MICROBIAL SYMBIONTS

Sponges are host organisms for various symbiotic microorganisms. Various microorganisms have been found in sponges such as archaea, heterotrophic bacteria, cyanobacteria, green algae, red algae, cryptophytes, dinoflagellates, and diatoms. The objectives of the research were to isolate and identify the *Axinella* sp. sponge-symbiotic microorganisms such as bacteria, micro fungi, and yeast. Sponge-symbiotic microorganisms that have been isolated consisted of 7 bacteria isolates, 3 micro fungi, and 2 yeast isolates. Result from this reasearch showed that the genus of bacteria was *Alteromonas*, *Bacillus*, and *Halomonas*, while a micro fungus is *Aspergillus*. From the sponge-symbiotic isolates obtained 2 bacteria, 1 micro fungus, and 2 yeast isolates have not been to identified.

Keywords : symbiotic microorganisms; identification; *Axinella* sp.; marine sponge

ABSTRAK

Sponge merupakan tempat hidup berbagai mikroorganisme yang bersimbiosis dengannya. Berbagai jenis mikroorganisme telah berhasil ditemukan dalam *sponge*, diantaranya adalah *archaea*, *heterotrophic bacteria*, *cyanobacteria*, *green algae*, *red algae*, *cryptophytes*, *dinoflagellates*, dan *diatoms*. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi mikroorganisme yang bersimbiosis dengan *sponge Axinella* sp. seperti bakteri, mikrofungi dan ragi. Mikroba yang berhasil diisolasi terdiri dari 7 isolat bakteri, 3 isolat mikrofungi dan 2 isolat ragi. Genus bakteri simbion *Axinella* sp. yang berhasil diidentifikasi adalah *Alteromonas*, *Bacillus*, dan *Halomonas*. Dari pnelitian ini genus mikrofungi yang berhasil diidentifikasi adalah *Aspergillus*. Dari isolat simbion yang diperoleh terdapat 2 isolat bakteri, 1 isolat mikrofungi, dan 2 isolat ragi yang belum berhasil diidentifikasi.

Kata kunci : mikroorganisme simbion; identifikasi; *Axinella* sp.; *marine sponge*

PENDAHULUAN

Sponge adalah invertebrata laut yang merupakan salah satu sumber potensial penghasil komponen bioaktif. Aktivitas biologis dari komponen bioaktif yang

terdapat dalam *sponge* adalah sitotoksik, antifungal, *inhibitor* divisi sel, antitumor, antiviral, anti-inflamasi, antimikroba dan aktivitas penghambatan enzim (Lee *et al.*, 2001). *Sponge* merupakan tempat hidup untuk berbagai mikroorganisme yang bersimbiosis dengannya. Mikroorganisme yang bersimbiosis dengan *sponge* dapat menjadi sumber untuk berbagai produk alam dari laut. Metabolit yang terkandung dalam *sponge* sangat terkait dengan metabolit yang disintesis oleh mikroorganisme simbiannya (Thakur dan Muller, 2004). Untuk membantu proses penemuan dari produk-produk bioaktif alami dari mikroba simbion *sponge* ini, dibutuhkan informasi yang lengkap mengenai taksonomi maupun sifat biokimianya (Newman *et al.*, 2000). Oleh karena itu mengisolasi dan mengidentifikasi mikroba simbion *sponge* ini menjadi langkah awal yang penting untuk dilakukan (Martin, 2002).

Berbagai jenis mikroorganisme telah berhasil ditemukan dalam *sponge*, diantaranya adalah *archaea*, bakteri heterotrofik, *cyanobakteria*, alga hijau, alga merah, *cryptophyta*, *dinoflagellata*, dan diatom. Satu individu inang *sponge* dapat memiliki bermacam-macam simbion di dalamnya. Sebagai contoh, pada tubuh *marine sponge Aplysina* terdapat bakteri yang heterogen seperti: *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Vibrio* sp., dan *Arthrobacter* sp. Dan pada beberapa *sponge* terdapat satu spesies mikroorganisme simbion yang dominan (Hentschel *et al.*, 2001).

* Departemen Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB, Kampus IPB Darmaga, Bogor.
Telp. 0251-621285

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan yang dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Hasil Perairan, diketahui bahwa *sponge Axinella* sp. memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker rahim A 2780. Untuk itu penelitian mengenai mikroba simbiosis *Axinella* sp. penting dilakukan sebagai langkah awal dalam mengetahui keterkaitan antara bahan aktif yang dikandung oleh *sponge* dan mikroba simbiosisnya.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi mikroorganisme yang bersimbiosis dengan *sponge Axinella* sp. yang terdiri dari bakteri, mikrofungal dan ragi (*yeast*). Identifikasi mikroorganisme dilakukan secara fisiologi dan biokimia. Penelitian ini dilanjutkan dengan identifikasi secara biologi molekuler dan karakterisasi bahan aktif yang dikandung oleh mikroba simbiosis.

Beberapa manfaat dari penelitian ini adalah diperolehnya informasi mengenai diversitas dan taksonomi dari mikroba yang bersimbiosis dengan *sponge Axinella* sp. dan informasi untuk penelitian lanjutan yaitu identifikasi molekuler 16S rRNA dan 18S rRNA yang akan dilakukan setelah penelitian ini selesai, penyediaan mikroorganisme (bakteri, mikrofungal, dan ragi) sebagai sumber untuk proses penemuan obat (*drug discovery*) dari laut, dan industri farmasi membutuhkan mikroba dari laut sebagai sumber alternatif pencarian obat.

METODOLOGI

Persiapan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *sponge* laut *Axinella* sp. atau *sponge* Jengger. *Axinella* sp. di ambil dari daerah perairan konservasi Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu untuk dibersihkan dari kotoran yang menempel. Selanjutnya *Axinella* sp. disimpan dalam air laut steril sebelum diisolasi mikrobaanya.

Metode

1. Pengkoleksian *sponge Axinella* sp.

Sponge Axinella sp. diambil dari Laut Kepulauan Seribu, khususnya di kawasan konservasi Pulau Pramuka. Proses pengkoleksian *marine sponge Axinella* sp. dalam penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2005 oleh CV DINAR di Jakarta. Dalam perjalanan menuju laboratorium *Axinella* sp. yang disimpan dalam air laut steril dengan salinitas 30 ppt (3 %) untuk menjaga agar mikroorganisme simbiosis tidak mati.

2. Pengisolasian simbiosis dari *sponge* laut

2.1. Isolasi bakteri laut yang bersimbiosis dengan *Axinella* sp.

Sebanyak 0,5 cm dari sampel *sponge Axinella* sp. secara aseptik dimasukkan ke dalam *blender* steril, setelah itu dihancurkan secara steril sampai homogen. Kemudian disebarakan secara merata pada *marine broth agar* 30 ppt (3 %), setelah itu dinkubasi pada suhu 20°C dan diamati setiap hari sampai terjadi pertumbuhan koloni bakteri pada biakan campuran.

Koloni bakteri yang terbentuk diambil dengan ose steril dan digoreskan pada media agar *marine broth* 30 ppt (3 %) kemudian diinkubasi pada suhu 20°C dan diamati setiap hari. Penggoresan dilakukan sampai terbentuk koloni tunggal yang terpisah. Setelah terbentuk koloni tunggal, sebanyak 1 ose bakteri diambil dan digoreskan ke media agar *marine broth* miring dan diinkubasi pada suhu 20°C untuk selanjutnya diidentifikasi.

2.2. Isolasi mikrofungal laut yang bersimbiosis dengan *Axinella* sp.

Sebanyak 0,5 cm dipotong dari sampel *sponge Axinella* sp. dan secara aseptik dimasukkan ke dalam *blender* steril, setelah itu dihancurkan secara steril sampai homogen. Kemudian disebarakan secara merata pada *marine potato dextrose agar* 30 ppt (3 %), setelah itu dinkubasi pada suhu 20°C dan diamati setiap hari sampai terjadi pertumbuhan koloni mikrofungal pada biakan campuran.

Koloni mikrofungal yang terbentuk diambil dengan ose steril dan digoreskan pada media *potato carrot agar* 30 ppt (3 %) kemudian diinkubasi pada suhu 20°C dan diamati setiap hari. Penggoresan dilakukan sampai terbentuk koloni tunggal yang terpisah. Setelah terbentuk koloni tunggal, sebanyak 1 ose mikrofungal diambil dan digoreskan ke media *potato carrot agar* miring dan diinkubasi pada suhu 20°C untuk selanjutnya diidentifikasi.

2.3. Isolasi *yeast* (ragi) laut yang bersimbiosis dengan *Axinella* sp.

Sebanyak 0,5 cm dipotong dari sampel *sponge Axinella* sp. dan secara aseptik dimasukkan ke dalam *blender* steril, setelah itu dihancurkan secara steril sampai homogen. Kemudian disebarakan secara merata pada media *marine potato dextrose agar* 30 ppt (3 %), setelah itu diinkubasi pada suhu 20°C dan diamati setiap hari sampai terjadi pertumbuhan koloni *yeast* pada biakan campuran.

Tabel 1. Karakteristik taksonomi dan identifikasi dari 7 jenis bakteri simbion *Axinella* sp.

Karakter	K-3	K-43	MM-1	<i>Alteromonas</i> (Bergey's dan Imada)	K-2	<i>Halomonas</i> (Bergey's)	K41-B	<i>Bacillus</i> (Bergey's dan Ivanova et al.)	K-1	K41-A
Gram stain	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Bentuk bakteri	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Kokkus	Kokkus
Warna Koloni	Kuning	Kuning	Merah	Kuning/Merah	Kuning	Kuning	Krem	NA	Kuning	Kuning
Motilitas	+	+	-	D (+/-)	+	+	-	+	+	-
Oksidasi	+	+	+	-	+	+	-	D (+/-)	+	-
Katalase	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
H ₂ S	+	-	-	NA	+	D (+/-)	-	NA	+	-
Selang Temperatur	20-30°C	20-30°C	20-30°C	4-40°C	20-30°C	5-37°C	20-30°C	10-55°C	20-30°C	20-30°C
Selang NaCl untuk tumbuh (%)	3%	3%	3%	2-10%	3%	1-20%	3%	0-7%	3%	3%
Hidrolisis Gelatin	-	+	+	+	+	NA	-	D (+/-)	+	-
Hidrolisis Urea	-	+	+	+	+	-	-	D (+/-)	+	-
Reduksi Nitrat	+	+	+	+	+	-	+	D (+/-)	+	+
Utilisasi Karbohidrat										
Glucose	-	-	-	D (+/-)	+	+	+	+	+	-
Sucrose	-	-	-	-	+	+	-	NA	+	-
Xylose	-	-	-	D (+/-)	+	+	+	D (+/-)	+	-
Mannitol	+	-	+	D (+/-)	-	NA	+	+	+	-
Lactose	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
Pendugaan Genus		<i>Alteromonas</i>			<i>Halomonas</i>		<i>Bacillus</i>			"Unidentified bacterium"
Nilai Pendugaan	86%	93%	86%		86%		90%			

Keterangan: NA = Not Applicable

Koloni *yeast* yang terbentuk diambil dengan ose steril dan digoreskan pada media GPY agar 30 ppt (3%) kemudian diinkubasi pada suhu 20°C dan diamati setiap hari. Penggoresan dilakukan sampai terbentuk koloni tunggal yang terpisah. Setelah terbentuk koloni tunggal, sebanyak 1 ose *yeast* diambil dan digoreskan ke media GPY agar miring dan diinkubasi pada suhu 20°C untuk selanjutnya diidentifikasi.

3. Pengidentifikasi isolat mikroba laut simbion *sponge Axinella* sp.

Tahapan identifikasi isolat mikroba laut simbion *sponge Axinella* sp. meliputi pengamatan morfologis, pengujian biokimia, pewarnaan gram, uji katalase, dan uji motilitas (Jackson dan Lily, 2001). Pengujian dilakukan terhadap bakteri, mikrofungal, dan *yeast* laut simbion *sponge Axinella* sp. Setelah tahapan identifikasi dengan pengujian biokimia dan fisiologis. Proses identifikasi untuk menentukan taksonomi dan nama spesies dari bakteri yang berhasil diisolasi dilanjutkan dengan menggunakan *Bergey's Manual* tahun 1994. Dan untuk *microfungi/yeast* dengan menggunakan *An introductory guide to the study of moulds (fungi)* (Malloch, 1997).

3.1. Identifikasi isolat bakteri laut simbion *Axinella* sp.

Identifikasi isolat bakteri laut simbion *sponge Axinella* sp. meliputi pewarnaan gram, uji katalase, serta beberapa uji biokimia dengan menggunakan kit *Microgen 24E*. Kit *Microgen 24E* terdiri dari 24 sumur reaksi pengujian biokimia ditambah uji oksidase, nitrat

dan motilitas. Pengujian biokimia dari Kit *Microgen 24E* meliputi reaksi dekarboksilase (*Lysine* dan *Ornithine*), fermentasi (glukosa, mannitol, xylosa, inositol, sorbitol, rhamnosa, sukrosa, laktosa, arabinosa, adonitol, rafinosa, dan salisin), produksi senyawa (beta galaktosidase, indol, urease, gelatinase, oksidase dan triptophane deaminase), pembentukan gas H₂S, pembentukan senyawa (sitrat dan malonat), reduksi nitrat, dan hidrolisis arginin.

3.2. Identifikasi isolat mikrofungal dan *yeast* laut simbion *Axinella* sp.

Identifikasi isolat mikrofungal dan *yeast* laut simbion *sponge Axinella* sp. hanya meliputi pengamatan secara morfologis yaitu membandingkan gambar isolat *microfungi* dan *yeast* di bawah mikroskop dengan kunci identifikasi *moulds/fungi isolation, cultivation, and identification* (Malloch, 1997).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Isolasi mikroba yang bersimbiosis dengan *sponge Axinella* sp.

Beberapa jenis mikroba yang diharapkan dapat diisolasi dari *sponge* adalah bakteri, mikrofungi, dan ragi. Berdasarkan tahapan isolasi langsung dari *sponge Axinella* sp. didapatkan 7 koloni bakteri yang tumbuh pada media *marine broth agar*, sedangkan pada media *marine potato dextrose agar* didapatkan 3 koloni mikrofungal dan beberapa koloni ragi (*yeast*).

Hasil isolasi biakan murni terdiri dari 7 isolat bakteri, 3 mikrofungi, dan 1 isolat ragi simbion *Axinella* sp.

2. Identifikasi mikroba simbiosis *Axinella* sp.

Bakteri

Dari isolat awal bakteri simbiosis *Axinella* sp. yang berhasil ditumbuhkan, didapatkan 7 jenis isolat murni atau biakan murni. Hasil identifikasi dari 7 jenis isolat murni bakteri yang terdapat pada *Axinella* sp. dapat dilihat pada Tabel 1. Bakteri tersebut diidentifikasi dengan metode konvensional yaitu secara fisiologis dan biokimiawi (Madigan *et al.*, 2003).

Berdasarkan karakteristik taksonomi pada Tabel 1, bakteri dengan kode K-3, K-43, dan MM-1 diidentifikasi sebagai genus *Alteromonas*. Dengan nilai pendugaan genus untuk isolat K-3 dan MM-1 sebesar 86 %, sedangkan untuk isolat K-43 sebesar 93 %. Isolat murni bakteri jenis K-2 teridentifikasi berbentuk batang, memiliki warna koloni kuning dan merupakan bakteri Gram negatif. Sesuai dengan hasil identifikasi biokimia maka isolat murni K-2 diidentifikasi sebagai genus *Halomonas*, dengan nilai pendugaan genus-nya sebesar 86 %. Isolat murni bakteri jenis K-41 B diidentifikasi berbentuk batang, memiliki warna koloni krem, dan merupakan bakteri Gram Positif. Bakteri K-41B diidentifikasi sebagai genus *Bacillus*, dengan nilai pendugaan genus-nya sebesar 90 %.

Secara morfologi isolat murni K-1 dan K-41 A diidentifikasi berbentuk *coccus* dan bersifat Gram negatif. Namun dengan menggunakan Bergey's Manual (1994) kedua bakteri tersebut tidak berhasil diidentifikasi, atau disebut juga "unidentified bacterium".

Dalam penelitian Hentschel *et al.* (2001), ditemukan berbagai jenis bakteri simbiosis *marine sponge Aplysina* yang heterogen seperti *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Arthrobacter* sp., *Vibrio* sp., *Pseudoalteromonas* sp., dan lain-lain. Dari penelitian lain yang dilakukan oleh Lee *et al.* (2001), beberapa bakteri yang umum terdapat sebagai simbiosis *marine sponge* antara lain adalah *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Cyanobacterium*, *Oscillatoria*, dan *Alteromonas*. Beberapa bakteri yang berhasil diidentifikasi pada *Axinella* sp. memiliki persamaan genus dengan bakteri simbiosis pada *sponge Aplysina* sp. yaitu genus *Alteromonas* dan *Bacillus*.

Mikrofungal dan Ragi

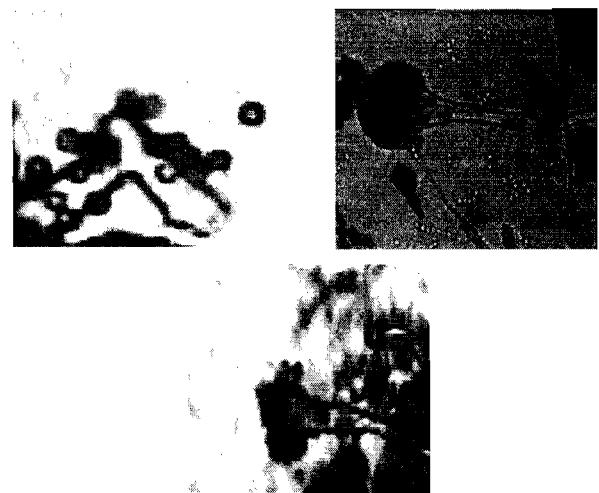
Identifikasi pada mikrofungal dan *yeast* simbiosis *Axinella* sp. dilakukan dengan membandingkan

morfologi isolat secara mikroskopis dengan kunci identifikasi *moulds/fungi isolation, cultivation, and identification* (Malloch, 1997). Berdasarkan hasil identifikasi morfologi, isolat murni mikrofungal J-2 dan J-3 diidentifikasi sebagai genus *Aspergillus*. Sedangkan isolat murni mikrofungal J-1 belum berhasil diidentifikasi secara morfologi dengan menggunakan kunci identifikasi *moulds/fungi isolation, cultivation, and identification* (Malloch, 1997).

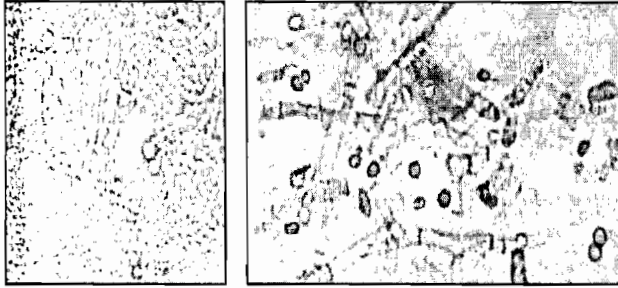
Dari 3 jenis isolat murni mikrofungal simbiosis *Axinella* sp. dapat diidentifikasi 2 dari 3 jenis diduga merupakan genus *Aspergillus*. Sedangkan pada penelitian Jensen dan Fenical (2000), *marine microfungi Aspergillus niger* merupakan simbiosis pada *marine sponge Hyrtios* sp. sehingga dapat disimpulkan *Aspergillus* juga merupakan simbiosis mikrofungal utama dari *Axinella* sp.

Identifikasi morfologi 3 isolat murni mikrofungal dan 2 isolat murni ragi (*yeast*) yang terdapat pada *Axinella* sp. secara mikroskopis dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.

Pada umumnya *sponge* lebih banyak berasosiasi dengan bakteri dan mikrofungal (Colwell, 2002). Namun saat ini penelitian mengenai ragi (*yeast*) sebagai simbiosis *marine sponge* yang merupakan kandidat dari proses pencarian bahan baku obat terus dikembangkan. Berdasarkan hasil identifikasi secara morfologi dengan menggunakan kunci identifikasi *An introductory guide to the study of moulds (fungi)* (Malloch, 1997), isolat murni ragi (*yeast*) Y-1 dan Y-2 belum berhasil diidentifikasi.



Gambar 1. Hasil pengamatan morfologi mikrofunga



Gambar 2. Hasil pengamatan morfologi ragi (*yeast*)

KESIMPULAN

Marine sponge Axinella sp. mempunyai 3 jenis mikroorganisme simbiosis yang berhasil diisolasi, yaitu bakteri, mikrofungal, dan ragi (*yeast*). Dari isolat awal bakteri simbiosis berhasil diisolasi 7 jenis isolat/biakan murni bakteri. Isolat murni K-3, K-43 dan MM-1 diidentifikasi sebagai *Alteromonas*. Isolat murni bakteri K-2 diidentifikasi sebagai *Halomonas*, dan K-41 B yang diidentifikasi sebagai genus *Bacillus*. Isolat murni K-1 dan K-41 A belum berhasil diidentifikasi secara morfologi dan biokimia.

Isolat murni mikrofungal J-2 dan J-3 diidentifikasi sebagai genus *Aspergillus*. Namun isolat murni mikrofungal J-1 dan isolat murni ragi (*yeast*), yaitu isolat Y-1 dan Y-2 belum berhasil diidentifikasi secara morfologi. *Aspergillus* merupakan mikrofungal simbiosis utama pada *marine sponge Axinella* sp. Selanjutnya metode identifikasi secara biologi molekuler diperlukan untuk mendapatkan nama spesies mikroba yang telah berhasil diisolasi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada CV DINAR yang telah membantu dalam pengambilan bahan penelitian di Kepulauan Seribu. Dan juga kepada Dr. Linawati Hardjito sebagai Kepala Laboratorium Bioteknologi Hasil Perairan atas bimbingannya dalam melaksanakan penelitian dosen muda ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Colwell RR. 2002. Fulfilling the promise of Biotechnology. *The Journal of Biotechnology Advances* 5226. Elsevier Science Ltd.
- Hardjito, L. 2004. Bioactive Compounds from Indonesian Marine Invertebrates and Their Sustainable Production through Mariculture. RUTI Year 2004.
- Hentschel U., Michael Schmid, Michael Wagner, Lars Fieseler, Christine Gernert, Jorg Hacker. 2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiology Ecology* 35;(305-312).
- Holt GH, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth edition*. Maryland USA: Williams and Wilkins Pub.
- Imada, C. 2000. Isolation of protease inhibitor producing marine bacteria and general properties of the inhibitor. *The 3rd JSPS International Seminar on Marine Biotechnology*. Tokyo University of Fisheries. Japan. hlm 367-369.
- Ivanova EP., Vysotskii MV., Svetashev VI., Nedashkovskaya OI, Gorshkova NM, Mikhailov VV., Yumoto N., Shigeri Y., Taguchi T. Yoshikawa S. 1999. Characterization of Bacillus strains of marine origin. *Journal of Internatl Microbiol* Vol 2;p (267-271). Springer-Verlag Iberica.
- Jackson EN, Lily Y. 2001. Ecology and industrial microbiology learning and earning from diversity. *Journal of Current Opinion in Microbiology Editorial Overview* Vol. 4; p (281-284). Elsevier Science Ltd.
- Jensen PR, Fenical W. 2000. *Marine microorganisms and drug discovery: current status and future potential*. In: Fusetani N, ed. *Drugs from the Sea*. S. Karger Publishing: Basel. 158 p.
- Lee KY, Lee HJ, Lee HK. 2001. Microbial Symbiosis in Marine Sponges. *The Journal of Microbiology*. 29: (4) (254-264).
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. USA: Pearson Education Inc. Prentice Hall.
- Malloch D. 1997. An introductory guide to the study of moulds (fungi). Department of Botany. University of Toronto. <http://www.google.com.html>. [28 Sep 2005]
- Martin, AP. 2002. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. (3673-3682).
- Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *J Nat Prod Rep* 17:215-34.
- Thakur NL, Muller EG. 2004. Biotechnological potential of marine sponges. *Journal of Current Science*. 86: (11).