

KERAGAMAN KARAKTER MORFOLOGI BAKTERI INDIGENOUS YANG DIISOLASI DARI LENDIR KATAK SAWAH (*F. CANCRIVORA*) LOKAL PADA BAGIAN DORSAL DAN VENTRAL

Lela Susilawati*, Afrizka Premana Sari

Prodi Pendidikan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

*Email: laylayahyasukatma@gmail.com

Abstract

F. cancrivora is an abundance species in Indonesia. It is believed that indigenous bacteria isolated from *F. cancrivora* have many bioactive substances. Different habitat of *F. cancrivora* will influence the bacteria lived in their mucous. Hence, comparing the morphological properties among them is one of preliminary assay to explore their potential as bioactive substances' producer.

The present work explored the diversity of morphological characteristic of indigenous bacteria isolated from skin mucous of *F. cancrivora*. The bacteria were isolated from dorsal and ventral skin mucous using swab method. The colonies that appeared on nutrient agar were then purified and characterized based on the colony and cell properties. A total 20 isolates were obtained, 11 of them are from dorsal site and 9 isolates are from ventral site. The morphological characteristic of those isolates showed that the bacteria isolated from dorsal site have higher diversity in term of colonies and cell characteristic than bacteria isolated from ventral site of frog skin mucous.

Keyword: *F. cancrivora*, frog skin mucous, indigenous bacteria, morphological characteristic

Pendahuluan

Katak sawah merupakan hewan kosmopolitan. Habitat katak sawah biasanya di areal persawahan yang tergolong lembab. Kondisi tersebut berpotensi terpaparnya katak sawah oleh bakteri, jamur, dan virus patogen misal oleh water mold *Saprolegnia* sp dan virus *Ambystoma tigrinum* (Culp *et al.* 2007).

Katak memiliki mekanisme pertahanan diri dalam melawan berbagai mikroorganisme patogen tersebut yaitu

dengan sekresi lendir pada pada permukaan kulitnya. Berdasarkan penelitian Barlian *et al.* (2011) ekstrak lendir kulit katak mengandung substansi antifungi yang mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans*, *Mycosporum gypseum* dan *Trychophyton mentagrophytes*. Culp *et al.* (2007), Lauer *et al.*, (2007) dan Harris *et al.*, (2008) melaporkan bahwa bakteri yang diisolasi dari lendir kulit katak mampu melawan bakteri dan fungi patogen. Salah satu

kapang patogen tersebut adalah *Batrachocytridium dendrobatidis* (Bd). Harris *et al.*, (2006) dan Woodhams *et al.*, (2007) melaporkan bahwa bakteri indigenous dari lendir kulit amfibi dapat menghambat pertumbuhan Bd penyebab penyakit *Cytridiomycosis* yang dilaporkan di beberapa negara seperti Spanyol, Venezuela (Bosch *et al.*, 2001), Australia dan Panama (Berger *et al.*, 1998) sebagai penyebab utama kepunahan beberapa jenis katak di dunia. *Janthinobacterium lividum* dan *Lysobacter gummosus* merupakan bakteri yang berhasil diisolasi berturut-turut dari kulit salamander dan *Plethodon cinereus* yang diketahui mampu melindungi katak (host) dari invasi fungi patogen Bd karena keduanya menghasilkan senyawa antifungi masing-masing adalah violacein dan 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) (Brucker *et al.*, 2008a).

Sejumlah bakteri *indigenous* yang memiliki aktivitas antifungi telah berhasil diisolasi dari beberapa spesies amfibi seperti *Rana muscosa* (Woodhams *et al.*, 2007) antara lain bakteri *Cyanobacteria*, *Firmicutes* dan *Proteobacteria* (McKenzie *et al.*, 2011), *Pseudomonas* (Lam *et al.*, 2010). Senyawa yang dihasilkanpun bervariasi.

Pemanfaatan bakteri indigenous katak sawah lokal sebagai biofungisida merupakan inovasi baru karena belum secara maksimal dikaji. pemanfaatan katak hanya untuk dikonsumsi karena dagingnya kaya protein. Padahal banyak hal yang bisa dikaji lebih mendalam dari keberadaan katak sawah ini, salah satunya adalah potensi bakteri indigenous dari lendir katak sawah lokal Bantul sebagai agensia *biological control* penyakit antraknosa pada tanaman cabai yang dilaporkan sebelumnya oleh Susilawati *et al.*, (2012).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman karakter

makroskopis dan mikroskopis dari bakteri indigenous yang diisolasi dari lendir kulit katak sawah lokal Muntilan. Bakteri indigenous yang diisolasi berasal dari bagian dorsal dan ventral karena perbedaan habitat dan lingkungan katak sawah dimungkinkan bisa menghasilkan variasi mikrobial simbiotik dari lendir kulit katak sawah yang memiliki potensi tertentu. Hal ini seperti dijelaskan Daly (1999) dan Rollin-Smith *et al.* (2005) bahwa senyawa bioaktif lendir katak dipengaruhi oleh spesies katak, lingkungan, dan makanan.

Bahan Dan Metoda

Preparasi sampel

Katak sawah (*F. cancrivora*) diperoleh dari areal persawahan Muntilan. Katak dibersihkan dengan akuades steril sebanyak tiga kali untuk menghilangkan bakteri *transient*.

Isolasi bakteri indigenous

Isolasi bakteri indigenous dilakukan dengan *swab methode* (Culp *et al.*, 2007, Harris *et al.*, 2006). Katak sawah yang sudah dibersihkan, diusap menggunakan alkohol 75%, kemudian *cotton bud* steril disapukan pada kulit katak bagian dorsal dan ventral. *Cotton bud* yang digunakan untuk menyapu kulit katak dicelupkan pada akuades steril sebanyak 10mL, suspensi dihomogenkan dengan vortex selanjutnya diencerkan (10^{-1}) dengan cara mengambil 1mL suspensi lalu dituang ke 9mL akuades steril. Hasil pengenceran diinokulasikan pada media NA dengan teknik *spread plate* dan diinkubasikan selama 24 jam suhu 37°C.

Purifikasi bakteri indigenous

Koloni yang menunjukkan karakter makroskopis berbeda selanjutnya dipurifikasi berkali-kali sehingga

didapatkan koloni tunggal yang murni. Purifikasi dilakukan dengan metode *streak plate* pada media NA.

Karakterisasi isolat

Karakterisasi isolat meliputi karakter mikroskopis dan makroskopis. Karakter makroskopis meliputi pengamatan warna koloni, bentuk, tepi, elevasi, dan struktur dalam koloni. Adapun karakter mikroskopis meliputi pengecaran Gram, motilitas, bentuk sel, dan susunan sel. Pengamatan mikroskopis dan makroskopis menggunakan metode Jutono *et al.*, (1973).

Hasil Dan Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh sebanyak 20 isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari bagian dorsal dan ventral lendir katak sawah, masing-masing 11 isolat dan 9 isolat. Karakter makroskopis dan mikroskopis tampak berbeda (Tabel 1). Sebagian besar isolat baik yang diperoleh dari bagian dorsal maupun ventral memiliki bentuk koloni *circular* dengan warna koloni dominan putih dan putih susu, meski ada warna lainnya seperti kuning (Gambar 1).

Tabel 1. Hasil pengamatan makroskopis isolat yang diisolasi dari lendir kulit katak sawah (*F. cancrivoria*).

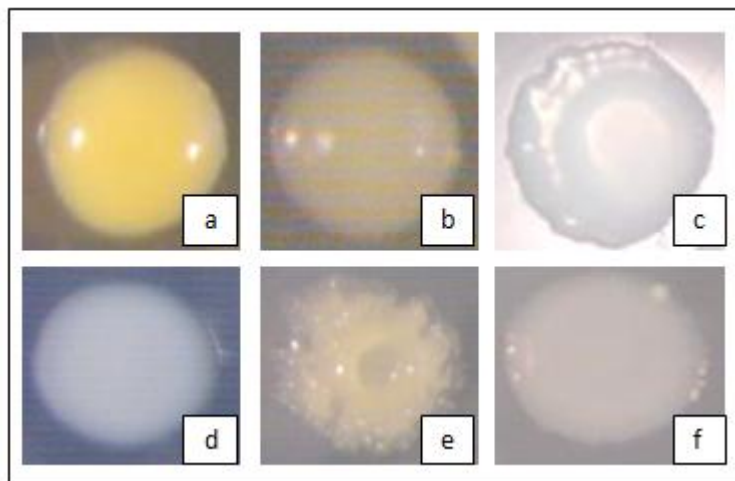
| Kode isolat | Pengamatan Makroskopis | | | | |
|-------------|------------------------|--------------|-------------|-------------|---------------|
| | Bentuk koloni | Warna koloni | Tepi Koloni | Elevasi | Stuktur dalam |
| KSMD1 | circular | krem | entire | raised | transparan |
| KSMD2 | circular | Putih susu | entire | raised | opaque |
| KSMD3 | circular | Putih | entire | raised | transparan |
| KSMD5kr | circular | krem | undulate | umbonate | translucent |
| KSMD5p | irregular | putih | entire | raised | opaque |
| KSMD7 | circular | putih | entire | raised | opaque |
| KSMD9 | circular | putih | entire | raised | opaque |
| KSMD10 | circular | Putih | entire | raised | Transparan |
| KSMD12 | circular | Putih susu | entire | raised | opaque |
| KSMD13 | circular | Putih susu | entire | raised | opaque |
| KSMD19 | circular | Putih susu | entire | raised | opaque |
| KSMV1 | circular | Kuning tua | entire | raised | opaque |
| KSMV2 | circular | oranye | entire | raised | opaque |
| KSMV3 | circular | putih | entire | raised | opaque |
| KSMV4 | circular | Krem | entire | raised | translucent |
| KSMV6 | circular | kuning | entire | raised | opaque |
| KSMV11 | circular | putih | entire | raised | translucent |
| KSMV12 | circular | Kuning cerah | entire | raised | opaque |
| KSMV15 | circular | Oranye | entire | raised | opaque |
| KSMV16 | irregular | Oranye muda | undulate | crateriform | opaque |

Sembilan isolat yang diisolasi dari lendir katak bagian ventral termasuk kelompok bakteri Gram positif dan 11 isolat dari bagian dorsal memiliki reaksi Gram berbeda, 6 isolat diantaranya

termasuk Gram positif dan 5 isolat lainnya Gram negatif. Sebagian besar isolat bakteri memiliki bentuk sel *coccus* dengan susunan sel *single*. Semua isolat bersifat motil (Tabel 2). Bentuk sel sebagian besar

adalah coccus dan beberapa ada yang berbentuk oval, bahkan isolat KSMD3

selnya berbentuk batang pendek (Gambar 2).



Gambar 1. Kenampakan koloni isolat bakteri indigenus yang diisolasi dari bagian ventral dan dorsal lendir katak sawah; a) KSM V1; b) KSM V12; c) KSM D5p; d) KSM D2; e) KSM V16; f) KSM V4

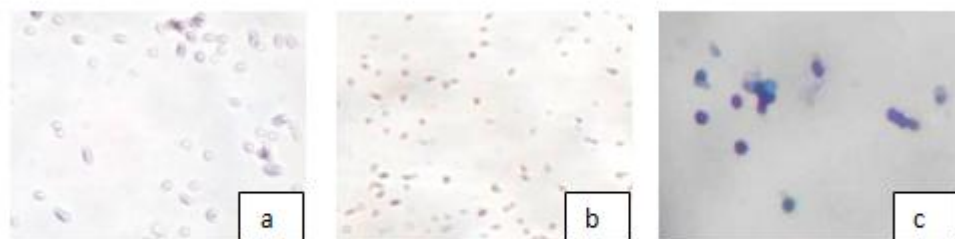
Keberadaan bakteri pada tubuh vertebrata dan avertebrata telah diungkap pada beberapa penelitian sebelumnya (Brucker *et al.*, 2008a; Brucker *et al.*, 2008b; Harris *et al.*, 2009). Simbiosis yang terjadi antara inang dengan bakteri yang menetap baik *resident* atau *epibiotic bacteria* merupakan simbiosis mutualisme. Keduanya memiliki keterikatan dalam melawan invasi mikrobia patogen (Dethlefsen *et al.*, 2007 dalam Harris *et al.*, 2009). Menurut Woodhams *et al.*, (2007) bakteri indigenus yang bersimbiosis dengan kulit katak berkontribusi dalam pertahanan

imunitas dari ancaman patogen. Isolat bakteri yang berhasil diisolasi sebagian besar berlendir. Ini menandakan bahwa sel bakteri mampu menghasilkan sejumlah lendir (substansi polimerik ekstraselular) yang berfungsi untuk menjaga kulit katak dari dehidrasi atau kekeringan dan berperan sebagai penghalang (*barrier*) dalam mencegah kolonisasi bakteri atau mikroorganisme patogen (Culp *et al.*, 2007) karena bersifat racun sehingga disebut kelenjer racun (*poison glands*) (Rollin-Smith *et al.*, 2005). Substansi tersebut dapat berupa alkaloid, biogenik amina, protein, dan steroid (Daly, 1997).

Tabel 2. Hasil pengamatan mikroskopis isolat yang diperoleh dari lendir kulit katak sawah (*F. cancrivoria*) Muntilan

| Kode isolat | Pengamatan Mikroskopis | | | |
|-------------|------------------------|------|-------------|-----------|
| | Bentuk Sel | Gram | Susunan Sel | Motilitas |
| KSMD1 | oval | - | single | motil |
| KSMD2 | oval | + | single | motil |

| | | | | |
|---------|---------------|---|--------|-------|
| KSMD3 | Batang pendek | + | single | motil |
| KSMD5kr | coccus | - | single | motil |
| KSMD5p | coccus | + | single | motil |
| KSMD7 | coccus | + | single | motil |
| KSMD9 | coccus | + | single | motil |
| KSMD10 | oval | - | single | motil |
| KSMD12 | coccus | + | single | motil |
| KSMD13 | coccus | - | single | motil |
| KSMD19 | oval | - | single | motil |
| KSMV1 | coccus | + | single | motil |
| KSMV2 | coccus | + | single | motil |
| KSMV3 | coccus | + | single | motil |
| KSMV4 | coccus | + | single | motil |
| KSMV6 | coccus | + | single | motil |
| KSMV11 | coccus | + | single | motil |
| KSMV12 | coccus | + | pair | motil |
| KSMV15 | coccus | + | single | motil |
| KSMV16 | oval | + | single | motil |



Gambar 2. Karakter mikroskopis sel isolat. a) isolat KSMD3; b) isolat KSMD19; c) KSMD7

Secara mikroskopis isolat bakteri dari bagian dorsal lebih beragam dari pada isolat yang diperoleh dari bagian ventral. Sebagian besar isolat bakteri ventral memiliki bentuk sel *coccus* dan Gram positif, sedangkan isolat bakteri dorsal berbentuk oval, *coccus* hingga batang pendek dengan sifat Gram positif dan negatif.

Jika diamati adanya penghasilan pigmentasi koloni maka isolat dari kulit ventral katak memiliki warna koloni mencolok seperti kuning hingga oranye. Berdasarkan kemampuannya dalam

menghasilkan pigmentasi warna maka isolat tersebut tergolong ke dalam bakteri *chromogenic* karena memiliki kemampuan dalam menghasilkan substansi ekstraseluler yang dikeluarkan ke permukaan koloni sehingga ada kemungkinan memiliki senyawa dengan bioaktivitas tinggi. Susilawati *et al.* (2012) melaporkan bahwa beberapa isolat bakteri indigen yang diisolasi dari lendir katak sawah lokal Bantul cukup potensial dalam menghambat pertumbuhan *Colletotrichum acutatum* NC32 penyebab antraknosa cabai dengan prosentase hambatan tinggi.

Isolat yang diperoleh dari lendir katak lokal Muntilan ini perlu dikaji lebih mendalam potensinya sebagai biofungisida karena ada kemungkinan habitat katak akan sangat berpengaruh pada potensi bakteri indigen yang hidup pada permukaan kulitnya.

Kesimpulan dan Saran

Diperoleh sebanyak 20 isolat bakteri indigen yang berhasil diisolasi dari lendir kulit katak sawah (*F. cancrivora*) lokal Muntilan pada bagian dorsal dan ventral dengan karakter morfologi bervariasi. Bentuk koloni yang paling dominan adalah *circular* sedangkan reaksi Gram bakteri dari bagian dorsal paling variatif.

Sarannya adalah perlu dikaji lebih lanjut dan mendalam akan kemampuan metabolik dari isolat bakteri tersebut misal dalam bidang pertanian untuk menghasilkan biofungisida dan kemampuan di bidang lainnya.

Daftar pustaka

- [1] Barlian, A., Kusnandar A., & Astuti K. (2011). Damage in fungal Morphology Underlies the Antifungal Effect of Lyophilisate of Granular Gland Secretion from *Duttaphrynus melanostictus* Frog. *Journal of Biological Sciences*. Vol (11), 282-287.
- [2] Brucker R.M., Baylor C. M., Walters R. L., Lauer A., Harris R. N., & Minbirole K.P.C. (2008a). The Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an Antifungal Metabolite Produce by Cutaneous Bacteria of Salamander *Plethodon cinereus*. *J Chem Ecol*. Vol (34), 39-43.
- [3] Brucker R. M., Harris R. N., Schwantes C. R., Gallaher T. N., Flaherty D. C., & Lam B. A. (2008b). Amphibian Chemical Defense: Antifungal Metabolites of The Microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on The Salamander *Plethodon cinereus*. *J Chem Ecol*. Vol (34): 1422-1429.
- [4] Berger, L., R. Speare, P. Daszak, D.E. Green, A.A. Cunningham, C.L. Goggin, R. Slocombe, M.A. Ragan, A.D. Hyatt, K.R. McDonald, H.B. Hines, K.R. Lips, G. Marantelli & H. Parkes. 1998. Cytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci*. Vol (95): 9031-9036
- [5] Bosch, J., I. Martinez-Solano & M. Garcia-Paris. 2001. Evidence of chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation*. Vol (97): 331-337
- [6] Culp, C. E., Joseph O., Falkinham I., & Lisa K. B.. (2007). Identification of The Natural Bacterial Microflora on The Skin of Eastern Newts, Bullfrog Tadpoles and Redback Salamanders. *Herpetologica*. Vol (63): 66-71.
- [7] Daly, W. John. 1997. *Biodiversity of alkaloids in amphibian skin: A dietary arthropod source*. Proceeding on International Conference on Biodiversity and Bioresources: conservation and utilization 23-27 Nov 1997. Phuket. Thailand
- [8] Harris, R. N., Timothy Y. J., Antje L., Marry A. S., Amit P. (2006). Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is Inhibited by Cutaneous Bacteria of Amphibian Species. *Ecohealth*. Vol (3): 53-56.
- [9] Harris R. N., Robert M. B., Jenifer B. W., Matthew H. B., Christian R. S., Devon C. F., Brianna A. L., Douglas C. W., Cheryl J. B., Vance T. V., Kevin P. M., (2009). Skin Microbes on Frog Prevent Morbidity and Mortality Caused by a Lethal Fungus. *The ISME Journal*. Vol (3): 818-824.
- [10] Jutono, Joedoro S., Sri H., Siti K., Suhadi D., Soesanto. (1973). *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum (untuk perguruan tinggi)*. Yogyakarta: Dept. Mikrobiologi Fak Pertanian UGM.
- [11] Lauer, A., Mary A. S., Jenifer L. B., Brianna A. L., & Reid N. H. (2008). Diversity of Cutaneous Bacteria with Antifungal Activity Isolated from Female Four-Toed Salamanders. *The ISME Journal* Vol (2): 145-157.
- [12] Lam, A. Brianna, J.B. Walke, V.T. Vredenburg & R.N. Harris. 2010. Proportion of individuals with anti-*Batrachochytridium dendrobatidis* skin bacteria is associated with population persistence in the frog *rana muscosa*. *Biological Conservation*. Vol (143): 529-531
- [13] McKenzie, J. Valerie, R.M. Bowers, N. Fierer, R. Knight & C.L. lauber. 2011. Co-habiting amphibian species harbor unique skin bacterial communities in wild populations. *The ISME journal*. 1-9
- [14] Rollin-Smith, L.A., L.K. Reinert, C.J. O'Leary, L.E. Houston & D.W. Woodhams. 2005. Antimicrobial peptide defense in amphibian skin. *Integr. Comp. Biol*. Vol (45): 137-142

- [15] Susilawati, L., A. Khusnuryani, L. Solihah. 2012. seleksi dan identifikasi bakteri *indigenous* dari lendir kulit katak sawah (*rana cancrivora*) yang berpotensi sebagai agensia biofungisida. *Seminar Nasional Biodiversitas "Konservasi Keanekaragaman Hayati Berbasis Kearifan Lokal Masyarakat Indonesia"* UNS Surakarta. 10 November 2012
- [16] Woodhams, D. C., Vance T. V., Mary A. S., Dean B., Bashar S., Yu S., Cheryl J. B., Louise A. R., & Reid N.H. (2007). Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Fejervarya muscosa*. *Biological Conservation*. Vol (30): 1-9.