

Mucus Epidermis *Clarias Batrachus* Merencat Pertumbuhan Bakteria Gram Negatif (The Epidermal Mucus Extract of *Clarias Batrachus* Inhibits Gram Negative Bacteria Growth)

AHMAD ZORIN SAHALAN, ENSKU SHARMILA & NAZAHYAH SULAIMAN

ABSTRAK

Mucus epidermis ikan kini telah dikenalpasti sebagai suatu sumber biologi yang kaya dengan pelbagai bahan bioaktif terutamanya peptida antibakteria. Kajian ini dilakukan bagi mengenal pasti potensi mucus epidermis *Clarias batrachus* (ikan keli kayu) sebagai sumber kepada bahan antibakteria. Sampel mucus dikumpul dari epidermis *C. batrachus* dan diekstrak menggunakan kaedah pengekstrakan akueus. Ujian penentuan aktiviti antibakteria ekstrak kasar mucus epidermis *C. batrachus* dilakukan dengan menggunakan kaedah spektrofotometrik. Hasil kajian menunjukkan terdapatnya aktiviti antibakteria oleh ekstrak kasar mucus dengan kepekatan 20 mg/ml terhadap pertumbuhan kedua-dua strain bakteria kajian, iaitu *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Hasil kajian ini menyokong peranan mucus sebagai salah satu sistem pertahanan badan serta komponennya, iaitu peptida antibakteria sebagai komponen utama dalam sistem pertahanan badan semulajadi. Justeru, penemuan ini boleh dijadikan sebagai salah satu langkah pertama ke arah pembangunan antibiotik kelas baru.

Kata kunci: *Clarias batrachus*; ikan keli kayu; mucus; epidermis; antibakteria

ABSTRACT

Recently, epidermal mucus of fish has been identified as a rich biological source of various bioactive substances, particularly antibacterial peptides. This study was conducted to identify the potential of epidermal mucosa of *Clarias batrachus* as a source of antibacterial material. Mucosal samples were collected from *C. batrachus* epidermis and extracted using an aqueous extraction method. Antibacterial activity of the crude epidermal mucus extract was determined by using spectrophotometric method. As a result there was antibacterial activity by the mucus extract against *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). The results of this study supports the role of mucus as a part of body immune system with antibacterial peptide as a component of innate body immune system. Hence, these findings can be used as one of the first steps towards the development of new class antibiotics.

Keywords: *Clarias batrachus*; cat fish; epidermal mucus; antibacterial

PENDAHULUAN

Antimikrob kebanyakannya berasal daripada sumber bahan semulajadi seperti mikroorganisma, haiwan dan tumbuhan. Haiwan marin khususnya ikan mempunyai potensi tinggi sebagai sumber agen antimikrob kerana ianya mempunyai sistem pertahanan perumah yang teguh bagi membolehkan ia kekal hidup di dalam persekitaran akuatik yang kaya dengan patogen bawaan air (Rakers et al. , 2013). Sebagai barisan pertahanan yang pertama, mucus epidermis ikan merupakan salah satu komponen sistem imun semulajadi yang melindungi ikan daripada risiko jangkitan patogen akibat pendedahan yang berterusan terhadap mikroorganisma (Safari et al. 2016). Beberapa kajian saintifik mendapati bahawa, di dalam mucus epidermis ikan terdapat bahan bioaktif imun semulajadi seperti, enzim proteolitik, lektin, lisozim, flavoenzim, immunoglobulin, protein C-reaktif dan peptida antibakteria (Ellis 2001; Whyte 2007; Subramaniam et al. 2008). Antara yang menariknya adalah peptida antibakteria yang telah ditemui dalam mucus epidermis ikan. Bahan ini telah dipencil dan dikenalpasti dalam pelbagai spesies ikan, antaranya adalah pelteobagrin, parasin I, myxinidin,

pardaxin dan pleurocidin (Rakers et al. 2013; Subramaniam et al. 2008).

Ikan keli kayu atau *Clarias batrachus* (Institut Penyelidikan Perikanan 2012) merupakan spesies ikan keli yang banyak ditemui di rantau Asia Tenggara. Ia merupakan spesies ikan yang tidak mempunyai sisik, justeru ia bergantung sepenuhnya kepada mucus epidermis sebagai rintangan mekanikal pertama terhadap patogen akuatik. Kemampuannya untuk bernafas di dalam udara apabila ketiadaan air menjadikannya suatu spesies ikan yang mempunyai daya tahan yang tinggi.

Ikan keli kayu juga turut mempunyai nilai ekonomi yang tinggi lantaran kos penternakan yang murah serta sumber protein yang baik untuk pemakanan manusia dan juga haiwan. Namun, potensi ikan keli kayu sebagai sumber produk bioaktif dari segi industri hiliran bioteknologi masih kurang dikaji serta diusahakan. Justeru itu, jika kajian dilakukan terhadap keberkesannya dalam mengawal serta menghindari infeksi bakteria, hasil daripada kajian dapat mengenengahkan bahan bioaktif novel untuk kajian selanjutnya dalam bidang perubatan maupun jagaan kesihatan. Oleh kerana itu, kajian ini memberikan penumpuan terhadap kesan mucus daripada

epidermis *Clarias batrachus* terhadap bakteria khususnya Gram negatif. Kaedah pengesanan ini akan dilakukan dengan spektrofotometer yang melihat akan kesan mukus terhadap lengkung pertumbuhan bakteria. Ia merupakan teknik sensitif kerana akan menunjukkan kehadiran aktiviti antibakteria walaupun pada jumlah bahan bioaktif yang sedikit. Selain itu, ia boleh memberikan hasil keputusan yang cepat dan boleh dianalisa secara kuantitatif. Kajian ini hanya tertumpu kepada bakteria Gram negatif sahaja iaitu *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* kerana bakteria ini merupakan bakteria patogen bawaan air.

BAHAN DAN KAEDAH

SAMPEL KAJIAN DAN KULTUR BAKTERIA UJIAN

Clarias batrachus atau ikan keli kayu diperolehi daripada penternak ikan keli di Ulu Langat. Ikan keli dikenal pasti serta disahkan melalui pengecaman oleh penternak dari baka asal. Umur ikan di selaraskan sama iaitu berumur antara 4-5 bulan. Bacteria *Escherichia coli* (ATCC 29522) dan *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) yang digunakan di dalam kajian ini diperolehi daripada Makmal Sains Bioperubatan, Fakulti Sains Kesihatan.

PENSAMPELAN IKAN DAN PENGUMPULAN SAMPEL MUKUS

Ikan keli kayu yang masih hidup dibersihkan terlebih dahulu dengan air suling steril. Sebanyak 500 ml air suling steril dimasukkan ke dalam bekas berisi ikan. Ikan dibiarkan semalaman di dalam bilik sejuk (4°C). Permukaan badan ikan yang telah mati dibilas dengan air suling dan mukus dikumpulkan dengan menggunakan spatula. Mukus yang telah dikumpulkan kemudiannya diempar pada 2500 rpm selama 10 minit pada suhu 4°C. Supernatan dikumpulkan dan seterusnya diempar pada 60 000 rpm selama 10 minit pada 4°C (Nagashima et al. 2001). Supernatan disimpan pada suhu -40°C bagi mengelakkan kerosakan pada sampel yang disebabkan oleh enzim.

FASA PERTUMBUHAN BAKTERIA YANG DIKAJI

Bakteria yang digunakan dalam ujikaji ini telah diselaraskan pada pertumbuhan fasa log awal sahaja. Pada peringkat fasa ini sel bakteria masih lagi baru dan aktif untuk dijalankan kajian anti-bakteria ke atasnya (Ahmad Zorin et al. 2000). Untuk mendapat pertumbuhan fasa log awal ini, bakteria perlulah dikultur terlebih dahulu di dalam kaldu nutrient dan di eram pada suhu 37°C. Kemudian pertumbuhan

bakteria akan di catat setiap 10 minit dengan menggunakan spektrofotometer pada jarak gelombang 625 nm.

PENENTUAN AKTIVITI ANTIBAKTERIA

Bakteria dieram selama 3 hingga 4 jam pada suhu 37°C untuk mendapatkan pertumbuhan bakteria pada fasa pertumbuhan log awal. Kemudian, kaldu ini diempar pada kelajuan 4000 rpm selama 10 minit dengan menggunakan tiub ependorf. Supernatan disingkirkan dan palet bakteria diampai dalam 10 ml larutan penimbal salin berfosfat (PBS) 0.1 M steril. Ampaian bakteria yang terhasil disetarakan kepekatannya pada bacaan OD₆₂₅ 0.5.

Apaian bakteria yang disediakan kemudian dibahagikan kepada tiga bahagian iaitu kawalan negatif, kawalan positif dan ujian. Kawalan positif mengandungi 40 ug Gentamycin bersama bakteria ujian, manakala untuk kawalan negatif hanya ampai bakteria sahaja yang ada di dalam kelalang (Patton et al. 2006). Kelalang ujian pula mengandungi mukus bersama bakteria ujian. Kesemua kelalang tersebut dimasukkan ke dalam mandian air yang bergoncang pada 50 psm (pusingan se minit). Pada selang masa 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 minit, sebanyak 1 ml sampel akan diambil pada setiap kelalang bagi setiap masa tersebut. Sampel yang di ambil akan dimasukkan ke dalam kuvet dan diuji akan kepekatan bakteria yang ada pada jarak gelombang 625 nm.

ANALISA KEHADIRAN ANTIBAKTERIA DIDALAM MUKUS

Graf kepekatan bakteria melawan masa di plotkan. Sebarang penurunan atau kenaikan pada kepekatan atau jumlah bakteria dianalisa sebagai kesan perencatan, bakterisidal ataupun tiada kesan bakterisidal. Pengambilan setiap sampel di lakukan secara tripliket untuk memenuhi syarat bacaan sishan piawai ("standard deviation").

HASIL

HASILAN DARIPADA PEMENCILAN MUKUS DINILAI DARI SEGI ISIPADU

Jadual 1 menunjukkan bahawa nilai keperatusan mukus yang dipencil berbanding berat ikan keli yang digunakan. Didapati daripada 1 kg ikan, hanya 13.75 ml atau 10.5 gram sahaja yang boleh dipencil dan nilai ini memberikan hanya 0.375% mukus yang boleh diperolehi oleh satu kilogram ikan.

JADUAL 1. Hasil Peratusan isipadu mukus yang dipencil per 1 kg berat ikan *Clarias batrachus*

Bilangan Ikan	Berat ikan keli (kg)	Isipadu mukus yang dipencil (gram)	Peratusan berat mukus yang dipencil per kg berat ikan
4 ekor	2.8	10.5	0.375%

**Nilai ini hanyalah untuk ikan keli yang telah pengsan atau mati dan ia tidak menggambarkan nilai jika ikan keli yang masih hidup. Ikan keli yang hidup atau aktif akan memberikan hasil mukus yang lebih tinggi.

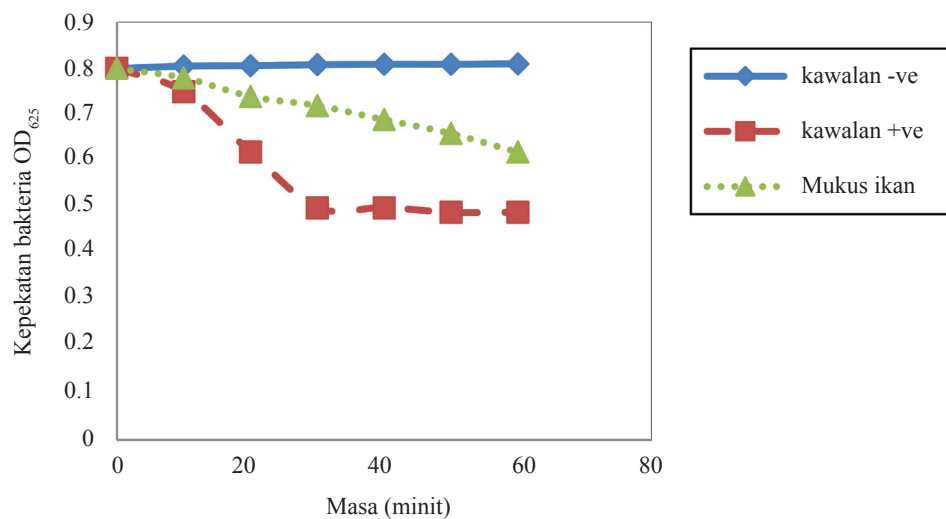
UJIAN PENENTUAN AKTIVITI ANTIBAKTERIA EKSTRAK MUKUS EPIDERMIS *C. BATRACHUS* KE ATAS *ESCHERICHIA COLI*

Bacaan OD bagi kawalan negatif menunjukkan bacaan yang agak mendatar iaitu bermula pada 0.8 pada minit 0 hingga ke 0.833 pada minit ke-60. Manakala kawalan positif iaitu kultur bakteria bersama antibiotik Gentamycin pula, memberikan penurunan bacaan penyerapan secara mendadak, iaitu daripada 0.80 pada minit ke-0 turun kepada 0.507 pada minit ke-60 (Rajah 1).

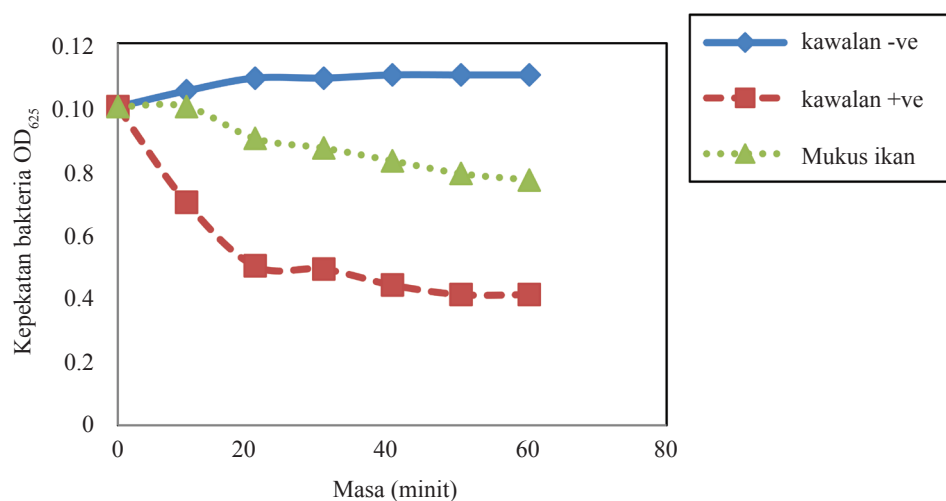
Seterusnya, untuk ekstrak mukus epidermis *C. batrachus*, bacaan OD yang diperolehi didapati jumlah bakteria mengalami penyusutan daripada minit ke-0 sehingga minit ke-60, iaitu dari 0.80 dan akhirnya turun kepada 0.619 (Rajah 1).

UJIAN PENENTUAN AKTIVITI ANTIBAKTERIA EKSTRAK MUKUS EPIDERMIS *C. BATRACHUS* KE ATAS *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Rajah 2 menunjukkan bacaan penyerapan OD₆₂₅ bagi kawalan negatif didapati dari minit 0 sehingga minit ke-60 bacaan pertumbuhan bakteria agak meningkat iaitu 0.100 ke pada 0.118 pada minit ke-60. Kawalan positif pula, menunjukkan pendedahan *P. aeruginosa* terhadap Gentamycin dan jumlah bilangan bakteria tersebut telah menurun dari 0.100 kepada 0.047 pada minit ke-60. Kesan ekstrak mukus *C. batrachus* terhadap *P. aeruginosa* menunjukkan bacaan OD menurun daripada 0.100 pada minit 0 kepada 0.085 pada minit ke-60.



RAJAH 1. Kepekatan bakteria OD₆₂₅ melawan masa (minit) menunjukkan aktiviti antibakteria ekstrak mukus epidermis *C. batrachus* terhadap terhadap *E. coli*. Kawalan negatif mengandungi suspensi bakteria sahaja manakala kawalan positif adalah campuran suspensi bakteria dengan 40 ug Gentamycin



RAJAH 2. Kepekatan bakteria OD₆₂₅ melawan masa (minit) menunjukkan aktiviti antibakteria ekstrak mukus epidermis *C. batrachus* terhadap *P. aeruginosa*. Kawalan negatif mengandungi suspensi bakteria sahaja manakala kawalan positif adalah campuran suspensi bakteria dengan Gentamycin

PERBINCANGAN

Mucus epidermis *Clarias batrachus* sebagai sumber kepada bahan antibakteria telah dikaji. Mucus yang telah dipencil melalui kaedah pengeskrakan akueus (Nagashima et al. 2001) ini menghasilkan jumlah yang sangat sedikit dan perlu disimpan pada suhu yang rendah iaitu -40°C bagi mengelakkan kehilangan aktiviti antibakteria (Yasemi 2017). Oleh kerana kestabilan bahan bioaktif di dalam mucus tidak diketahui serta mungkin cepat terdegradasi maka kaedah ujian antibakteria mucus *C. batrachus* menggunakan spektrofotometer dipilih kerana ujian ini menyediakan kaedah yang lebih ringkas, cepat dan sensitif (Giardino et al. 2016) berbanding dengan kaedah konvensional iaitu resapan telaga atau resapan cakera. Kaedah ini berupaya mengesan kadar peningkatan atau penurunan pertumbuhan jumlah bilangan bakteria apabila didedahkan pada mucus atau antibiotik dengan cepat dan tepat (Patton et al. 2006).

Hasil kajian mendapati bahawa jumlah bilangan *E. coli* dan *P. aeruginosa* telah menurun apabila bakteria ini didedahkan terhadap mucus *C. batrachus* berbanding dengan kawalan negatifnya iaitu bakteria tanpa mucus. Ini jelas bermakna bahawa sel bakteria telah termusnah atau lisis sel berlaku (Ahmad Z. Sahalan et al. 2008) yang mengakibatkan bacaan penyerapan ketumpatan optikal spektrofotometer atau OD (“optical density”) itu menurun secara berperingkat atau berurutan. Namun penurunan bacaan untuk mucus tidak seperti kawalan positif yang menggunakan antibiotik tulen. Ini adalah kerana ujian antimikrobial kawalan positif sudah tentu akan memberikan bacaan perencatan yang tinggi kerana ianya menggunakan antibiotik yang tulen jika dibandingkan dengan bahan antibakterial yang berada dalam ekstrak kasar (Gould 1999). Selain itu, kepekatan bahan bioaktif di dalam mucus mungkin adalah rendah serta ia bukan merupakan komponen yang dominan dalam mucus, maka kesan yang di tunjukkan adalah sedikit dan mungkin aktiviti amat perlahan (Choulou et al. 2017).

Walau bagaimanapun, sebagai kesimpulan daripada pemerhatian ini menunjukkan bahawa adanya komponen bioaktif didalam mucus ikan *C. batrachus* yang mengakibatkan kesan bakterisidal. Corak penurunan bilangan bakteria akibat pendedahan terhadap mucus ini adalah mengikut penurunan kawalan positif ujikaji walaupun kecerunan penurunannya berbeza. Namun bakteria Gram negatif khasnya *E. coli* dan *P. aeruginosa* mampu dikawal infeksi dan pertumbuhannya oleh komponen bioaktif yang ada di dalam mucus ikan ini.

KESIMPULAN

Kajian ini menilai keberkesanan antibakteria mucus ikan keli terhadap dua bakteria gram negatif iaitu *E. coli* dan *P. aeruginosa*. Sebagai kesimpulannya, hasil ujikaji menunjukkan bahawa terdapat kehadiran bahan antibakteria

di dalam mucus ikan keli *C. batrachus* yang memberikan kesan bakterisidal terhadap bakteria yang diuji.

PENGHARGAAN

Penghargaan kepada geran No. Industri 2013-049 dan juga Makmal Sains Bioperubatan PPSDKG, Fakulti Sains Kesihatan, UKM, khasnya pada Pn Mariahyati Abu Bakar dan En. Faisal Ariffin.

RUJUKAN

- Ahmad Z. Sahalan & Ronald A. Dixon. 2008. Role of the cell envelope in the antibacterial activities of polymyxin B and polymyxin B nonapeptide against *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31: 224-227.
- Ahmad Zorin, S., Mohd. Zaki, S., Nihayah, M. & Ridzwan, B.H. 2000. Kesan perencatan *Holothurid edulis* terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Pascasidang Simposium Sains Kesihatan Kebangsaan Malaysia Ke-3*, Fakulti Sains Kesihatan Bersekutu, Universiti Kebangsaan Malaysia. m/s 13.
- Chouhan, S., Sharma, K. & Guleria, S. 2017 Antimicrobial Activity of Some Essential Oils-Present Status and Future Perspectives. *Medicines (Basel)*. 2017 Aug 8; 4(3). pii: E58.
- Ellis, A.E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 827-839.
- Giardino, L., Estrela, C., Generali, L., Mohammadi, Z. & Asgary, S. 2015. The in vitro Effect of Irrigants with Low Surface Tension on *Enterococcus faecalis*. *Iran Endod J. Summer* 10(3): 174-8.
- Gould, I. M. 1999. A review of the role of antibiotic policies in the control of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43(4): 459-465.
- Nagashima, Y., Sendo, A., Shimakura, K., Kobayashi, T., Kimura & Fujii, T. 2001. Antibacterial factors in skin mucus of rabbit fishes. *Journal of Fish Biology* 58: 1761-1765.
- Patton, T., Barrett, J., Brennan, J. & Moran, N. 2006. Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *Journal of Microbiological Methods* 64(1): 84-95.
- Rakers, S., Niklasson, L., Steinhagen, D., Kruse, C., Schaubert, Ju`rgen, Sundell, K. & Paus, R. 2013. Antimicrobial Peptides (AMPs) from Fish Epidermis: Perspectives for Investigative Dermatology. *Journal of Investigative Dermatology* 133: 1140-1149.
- Safari, R., Hoseinifar, S.H., Nejadmoghadam, S. & Jafar, A. 2016. Transcriptomic study of mucosal immune, antioxidant and growth related genes and non-specific immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary Ferula (*Ferula assafoetida*). *Fish Shellfish Immunol* 55: 242-8.
- Subramanian, S., Ross, N.W. & MacKinnon, S.L. 2008. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 150: 85-92.

- Whyte, S.K. 2007. The innate immune response of finfish – A review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology* 23(6): 1127-1151.
- Yasemi, M. 2017. Prevention of denaturation of freshwater crayfish muscle subjected to different freeze-thaw cycles by gelatin hydrolysate. *Food Chem.* 2017 Nov 1; 234:199-204. doi: 10.1016/j. foodchem.2017.04.183.

Ahmad Zorin Sahalan
Engku Sharmila
Program Sains Bioperubatan
PPSDKG, Fakulti Sains Kesihatan, UKM
Jalan Raja Muda Abd. Aziz
50300, Kuala Lumpur

Nazahiyah Sulaiman
Jabatan Perkhidmatan Veterinar
Kementerian Pertanian dan Industri Asas Tani
62624 Presint 4, Wilayah Persekutuan Putrajaya

Pengarang untuk dihubungi: Ahmad Zorin Sahalan
Emel: ahmadzorinsahalan@ukm.edu.my
Tel: +603-92897175
Faks: +603-26929032

Diterima: Ogos 2017
Diterima untuk diterbitkan: Januari 2018