

ISOLASI JAMUR SIMBION ASCIDIA *Schizophyllum commune* YANG MEMILIKI AKTIVITAS ANTIBAKTERI

(Isolation of Ascidian Symbiotic Fungi *Schizophyllum commune* with
Antibacterial Activity)

Gianfranco Montolalu¹, Deiske A. Sumilat^{1*}, Natalie D. C. Rumampuk¹,
Inneke F. M. Rumengan¹, Rosita A. J. Lintang¹, Reny L. Kreckhoff²

¹Program Studi Ilmu Kelautan, FPIK, UNSRAT

²Program Studi Budidaya Perairan, FPIK, UNSRAT

*E-mail: Deiske.sumilat@gmail.com

ABSTRACT

Ascidian is a benthic invertebrate that produces secondary metabolites. The substances were produced by the ascidian as self-defense from many environmental factors. Several studies report the similar structure between the substances extracted from ascidian and symbiotic fungi with biological activities. This study aims to isolate fungi associated with ascidian *Eudistoma* sp., then observe its potency on inhibiting bacteria *S. aureus* dan *A. hydrophila*. PDA was used to isolate and culture fungal isolate, then extraction using solvent ethyl acetate. Antibacterial activity of this symbiotic fungi isolates extract was performed using the Kirby-Bauer disc diffusion method. Molecular identification of fungi results that the symbiotic fungi were *Schizophyllum commune*. The observing result showed that fungal extract has the ability on inhibiting the growth of *S. aureus* and with the inhibition zone 8 mm and *A. hydrophila* 8,5 mm.

Keywords: Ascidian, *Eudistoma* sp., *Schizophyllum commune*, Symbiotic, Antibacterial.

Ascidia merupakan avertebrata bentik yang memproduksi senyawa metabolit sekunder. Senyawa tersebut diproduksi sebagai bentuk pertahanan diri ascidia terhadap berbagai faktor lingkungannya. Beberapa penelitian menunjukkan kesamaan struktur antara senyawa yang diekstraksi dari ascidia dan jamur simbiosis dengan aktivitas biologis yang kuat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi jamur yang bersimbiosis dengan ascidia *Eudistoma* sp., kemudian melihat potensinya dalam menghambat bakteri uji *S. aureus* dan *A. hydrophila*. Isolasi dan kultur jamur menggunakan media PDA, kemudian ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak jamur simbiosis dilakukan dengan metode difusi cakram Kirby-Bauer. Identifikasi molekuler jenis jamur diperoleh bahwa jamur simbiosis tersebut adalah jenis *Schizophyllum commune*. Hasil pengamatan menunjukkan ekstrak jamur memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S.aureus* dengan diameter zona hambat 8 mm dan *A. hydrophila* 8,5 mm.

Kata kunci : Ascidia, *Eudistoma* sp., *Schizophyllum commune*, Simbiosis, Antibakteri.

PENDAHULUAN

Ascidia merupakan salah satu biota bentik dengan jumlah spesies yang telah ditemukan sekitar 3000 spesies (Shenkar dan Swalla, 2011), dan menjadi salah satu sumber produk alami yang sangat penting aplikasinya dalam biomedis dan

farmasetika. Ascidia merupakan sumber bahan alami yang menarik dan memiliki aktivitas biologis (Sumilat, 2014). Berbagai macam metabolit sekunder diproduksi ascidia untuk menghindari pemangsa dan penempelan organisme (Watters, 2018). Beberapa tahun terakhir, penelitian

tentang ascidia semakin berkembang dan mengarah pada isolasi metabolit sekunder dengan aktivitas biologis yang kuat. Beberapa laporan menunjukkan bahwa pada ascidia telah ditemukan berbagai senyawa bioaktif yang memiliki potensi aktivitas antitumor/ antikanker (Tatsuta *et al.*, 2017; Sumilat *et al.*, 2018; Watters, 2018), sitotoksik (Wewengkang *dkk.*, 2014), antioksidan (Sumilat *et al.*, 2019) protein PTP 1B inhibitor (Yamazaki *et al.*, 2015; Sumilat *et al.*, 2017) dan antimikroba/antibiotik (Bara *dkk.*, 2015; Sumilat *et al.*, 2018; Sumilat *et al.*, 2019; Casertano *et al.*, 2020). Akan tetapi, ekstraksi organisme laut secara besar-besaran bertentangan dengan kepentingan konservasi (Pastra *dkk.*, 2012) dan berpotensi mengganggu keseimbangan pada ekosistem di perairan.

Ascidia menjadi tempat hidup bagi berbagai komunitas mikroba yang merupakan sumber tambahan produk alami yang bersifat sitotoksik, antimikroba, antioksidan, anti inflamasi dan masih banyak lagi (Casertano *et al.*, 2020). Chen *et al.* (2018) melaporkan bahwa sekitar hampir 8% metabolit sekunder dari ascidia faktanya diproduksi oleh mikroorganisme simbiosis. Jamur yang berasal dari laut diketahui memproduksi senyawa metabolit sekunder baru yang memiliki aktivitas biologis (Hasan *et al.*, 2015). Banyak sekali senyawa metabolit sekunder yang telah ditemukan pada beberapa tahun terakhir. Kebanyakan dari metabolit sekunder yang berasal dari jamur laut sangat sukar didapatkan pada jamur yang hidup di darat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi jamur yang bersimbiosis dengan ascidia *Eudistoma* sp. serta potensi aktivitas antibakterinya dalam menghambat bakteri uji *S. aureus* dan *A. hydrophila*.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dikerjakan selama ± 3 bulan, dimulai pada September 2020 dan berakhir November 2020. Penelitian diawali dengan sampling ascidia di perairan Bunaken, Sulawesi Utara. Kegiatan isolasi jamur hingga pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasetika Laut, FPIK UNSRAT.

Pengambilan dan Identifikasi Sampel Ascidia

Ascidia diambil dengan cara dipotong langsung pada substratnya menggunakan pisau. Perairan lokasi pengambilan sampel memiliki kedalaman 3-7 meter, sehingga digunakan alat bantu satu set alat *snorkeling*. Identifikasi organisme ascidia berdasarkan morfologinya yang tampak meliputi bentuk, tekstur, warna, posisi *zooid* dan kloaka, dipandu dengan buku pedoman Colin dan Arneson (1995).

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yakni *Aluminium foil*, autoklaf, botol kaca kecil, cawan petri, corong Buchner, corong plastik, *freeze dryer*, gelas piala, gelas ukur, gunting, ose, jarum, kamera, kertas cakram, kertas label, kertas saring, kotak steril, labu erlenmeyer, labu ukur, *laminar air flow*, lampu bunsen, lampu UV, *micropipet*, mistar, oven, pengaduk kaca, pinset, pisau bedah, plastik parafilm, plastik *zip lock*, rak tabung reaksi, 1 set *rotary vacuum evaporator*, sarung tangan, spatula, tabung reaksi, talenan, timbangan analitik, tip, tisu dan wadah/ loyan.

Bahan yang digunakan seperti *A. hydrophila*, *agar*, *air laut saring 50%*, *akuades*, *beras*, *etil*

asetat, ekstrak daging, methanol p.a, NaCl, pepton, PDA, sampel ascidia dan *S. aureus*.

Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat seperti cawan petri, labu erlenmeyer, tabung reaksi, pisau, pinset yang telah dicuci selanjutnya di bungkus dengan kertas dan disterilkan menggunakan oven pada suhu 160 °C selama 2 jam. Untuk bahan berupa media isolasi dan media pengujian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit.

Pembuatan Media PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Media PDA merupakan media yang sering digunakan untuk keperluan penumbuhan jamur di laboratorium. Media PDA dibuat dengan melarutkan 3,9 gram PDA dan 1 gram agar dalam 100 ml air laut saring 50%. Media disterilkan menggunakan autoklaf, didinginkan pada suhu ruang selama \pm 15 menit kemudian dituang pada cawan petri steril.

Isolasi dan Kultur Jamur

Sampel ascidia dipotong kecil-kecil, dibilasi dengan air laut steril, direndam dalam etanol 70% selama 1-2 menit untuk sterilisasi bagian permukaan, dilanjutkan dengan membilas sampel dengan air laut steril untuk menghentikan proses sterilisasi permukaan. Sampel kemudian ditanam pada media PDA yang telah disiapkan. Kegiatan ini dilakukan dalam keadaan aseptis di *laminar air flow*. Cawan petri dibungkus dengan plastik *wrap*, kemudian diinkubasi selama 3x24 jam.

Jamur mulai tumbuh disekitar sampel setelah inkubasi, dan jamur-jamur tersebut dikultur secara

berulang pada media PDA hingga didapatkan isolat murni jamur. Kultur jamur dilakukan dengan mengambil jamur yang tumbuh menggunakan pisau dan ditanam pada media PDA yang baru. Seluruh kegiatan isolasi hingga ekstraksi menggunakan panduan dalam Kjer (2010) dengan beberapa modifikasi.

Pembuatan Media Nasi

Nasi merupakan salah satu media yang digunakan untuk perbanyakan kultur isolat jamur. Media Nasi dibuat dengan memasukkan beras yang telah dicuci bersih sebanyak 50 gram dan 60 ml air laut saring 50% ke dalam labu erlenmeyer 250 ml. Erlenmeyer ditutup dengan *aluminium foil* dan dibiarkan semalaman. Media disterilisasi dengan autoklaf kemudian diinkubasi selama 2 hari.

Kultur Isolat Jamur pada Media Nasi

Isolat murni jamur yang tumbuh pada media PDA dipindahkan ke media nasi dengan memotong media yang tertutupi dengan jamur. Inkubasi dilakukan selama 14 hari hingga jamur tumbuh pada media nasi.

Ekstraksi Isolat Jamur Symbion

Jamur yang telah tumbuh pada media nasi membentuk seperti bongkahan nasi sehingga perlu untuk dihancurkan dengan pengaduk kaca. Maserasi dilakukan dengan pelarut etil asetat sebanya 110 ml. Maserasi dilakukan sebanyak tiga kali, selanjutnya maserat disaring dan dievaporasi pada suhu 40 °C. Ekstrak yang didapatkan dikeringkan dengan bantuan alat *freeze dryer*. Ekstrak kering dilarutkan dalam metanol p.a dengan konsentrasi 10.000 ppm.

Kultur Bakteri Uji

Bakteri uji dikultur menggunakan media B1 cair. Media dibuat dengan melarutkan 0,25 gram pepton, 0,15 gram NaCl dan 0,15 gram ekstrak daging dalam 50 ml akuades. Media disterilkan menggunakan autoklaf, selanjutnya dibiarkan hingga dingin dan ditambahkan bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Aeromonas hydrophila* sebanyak 100 µl dalam 1 ml media. Inkubasi dilakukan selama 1x24 jam.

Pembuatan Media Uji Antibakteri

Media pengujian antibakteri B1 padat dibuat dengan melarutkan 0,5 gram pepton, 0,3 gram NaCl, 0,3 gram ekstrak daging dan 2 gram agar dalam 100 ml akuades. Media disterilkan menggunakan autoklaf, kemudian didinginkan pada suhu ruang selama \pm 15 menit. Bakteri ditambahkan pada media, dikocok dan segera dituang ke dalam cawan petri steril.

Pembuatan Kontrol Uji Antibakteri

Kontrol positif pada penelitian ini menggunakan kloramfenikol sebagai tolak ukur zona hambat ekstrak isolat jamur, sedangkan kontrol negatif menggunakan metanol p.a yang dipakai untuk melarutkan ekstrak kering. Kontrol positif dibuat dengan melarutkan 250 mg kloramfenikol

Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Jamur Simbion

Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan panduan dalam Hudzicki (2009) dengan beberapa modifikasi. Pada pengujian ini digunakan sediaan ekstrak dengan konsentrasi 10.000 ppm, kontrol positif kloramfenikol dan kontrol

negatif metanol p.a. Masing-masing larutan ditotolkan pada kertas cakram berdiameter 6 mm sebanyak 20 µl. Kertas cakram ditaruh pada media uji dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1x24 jam. Pengamatan dilakukan setelah 1x24 jam dan 2x24 jam masa inkubasi. Pengukuran diameter zona hambat menggunakan mistar dan kontrol positif digunakan sebagai pembanding.

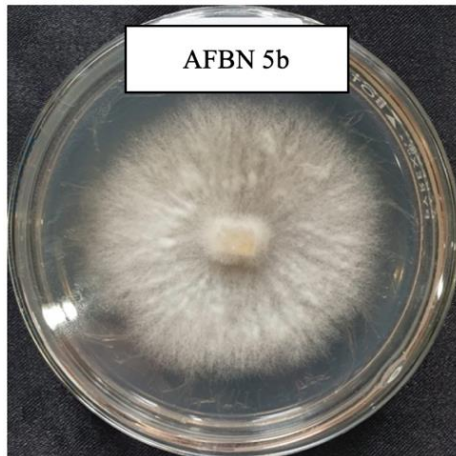
HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel ascidia yang digunakan dalam penelitian ini setelah diidentifikasi menggunakan buku panduan Colin dan Arneson (1995). Diperoleh bahwa ascidi tersebut merupakan jenis *Eudistoma* sp. dengan ciri berwarna coklat, *zooid* tersusun melingkar mengelilingi kloaka yang tertanam pada tunik yang tebal dan keras.



Gambar 1. *Ascidia Eudistoma* sp.
Hasil Isolasi dan Kultur Jamur

Isolasi terhadap jamur simbion ascidia diperoleh bahwa jamur tumbuh disekitar sampel ascidia setelah inkubasi selama 3x24 jam. Kultur terhadap jamur simbion dilakukan dengan mengambil jamur yang tumbuh di sekitar sampel dan ditanam pada media PDA baru. Kultur dilakukan secara berulang hingga diperoleh isolat murni seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. Isolat murni jamur

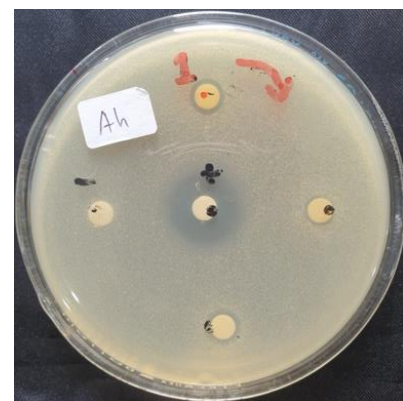
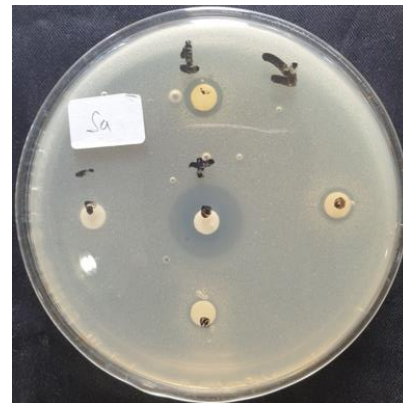
Identifikasi terhadap isolat jamur simbion ascidia tersebut dilakukan dengan analisis molekuler DNA. Isolat jamur dikirim ke Laboratorium Genetika Science, Jakarta, dan didapatkan hasil bahwa jamur simbion *Eudistoma* sp. 5,8s ribosomal RNA *gene* adalah *Schizophyllum commune* dengan tingkat keakuratan 99%.

Ekstraksi Jamur Simbion Ascidia

Isolat jamur yang ditanam pada media nasi setelah inkubasi selama 14 hari dimaserasi dengan pelarut etil asetat 110 ml. Maserasi dilakukan sebanyak tiga kali dan kemudian maserat disaring dan dievaporasi. Ekstrak kasar hasil evaporasi didapatkan 3 ml. Pengeringan dilakukan dengan alat *freeze dryer* dan didapatkan berat kering ekstrak sebanyak 0,719 gram.

Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

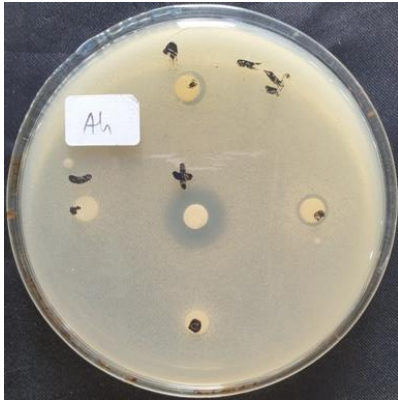
Adanya aktivitas antibakteri dilihat berdasarkan zona bening yang ada di sekitar kertas cakram. Pengamatan dilakukan dengan mengukur zona bening tersebut menggunakan mistar. Hasilnya dibuat tabulasi dengan diameter zona hambat dalam satuan milimeter. Pengamatan dilakukan setelah 1x24 jam dan 2x24 jam inkubasi.



Gambar 3. Pengamatan uji antibakteri setelah 1x24 jam.

Pengamatan setelah inkubasi 1x24 jam didapatkan zona hambat ekstrak isolat jamur sebesar 8 mm pada bakteri *S. aureus* dan *A. hydrophila* sebesar 8,5 mm. Sebagai pembandingan, kontrol positif menghasilkan zona bening sebesar 19 mm. Kontrol negatif tidak memberikan adanya aktivitas.





Gambar 4. Pengamatan uji antibakteri setelah 2x24 jam.

Pengamatan setelah 2x24 jam menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dengan zona hambat pada *S. aureus* sebesar 8 mm dan *A. hydrophila* 8,5 mm. Penurunan aktivitas terjadi pada kontrol positif kloramfenikol di bakteri uji *A. hydrophila* menjadi 15 mm.

Efisiensi yang lebih tinggi oleh kloramfenikol dibandingkan dengan ekstrak isolat jamur menurut Opa dkk. (2018) dikarenakan kloramfenikol merupakan antibiotik yang berspektrum luas dan telah diketahui konsentrasi yang paling tepat dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan hasil penelitian, menurut Davis dan Stout (1971), ekstrak isolat jamur simbion ascidia memiliki aktivitas antibakteri yang tergolong sedang. Menurut WHO (2014), antibiotik digolongkan berdasarkan spektrum luas (bekerja aktif pada berbagai jenis bakteri) dan sempit (hanya bekerja secara aktif pada satu golongan bakteri, baik gram positif ataupun gram negatif). Ekstrak jamur simbion ascidia tergolong ke dalam antibakteri spektrum luas berdasarkan kemampuannya dalam menghambat baik gram positif maupun gram negatif.

Spesies jamur *S. commune* diketahui memiliki aktivitas antibakteri yang menjanjikan. Joel

dan Bima (2013) melaporkan ekstrak jamur *S. commune* memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan ketiga bakteri uji (*Vibrio cholerae*, *Micrococcus luteus* dan *S. aureus*), dimana fraksi yang aktif ditentukan menggunakan GC-MS dan diperoleh molekul aktif tersebut adalah asam ftalat. Hastuty *et al.* (2020) juga melaporkan bahwa ekstrak *S. commune* memiliki aktivitas dalam menghambat ketiga bakteri uji (dua strain bakteri gram positif *B. cereus* dan gram negatif *E. cloacae*).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan terhadap ekstrak jamur *S. commune* yang diisolasi dari ascidia *Eudistoma* sp. didapatkan bahwa ekstrak tersebut memiliki aktivitas antibakteri yang tergolong sedang dengan spektrum luas.

DAFTAR PUSTAKA

- Bara, R. A., G. D. Kadow, A. R. B. Ola dan J. Posangi. 2015. Analisis Senyawa Antibiotik dari Jamur Simbion yang Terdapat dalam Ascidian *Didemnum molle* di Sekitar Pulau Bunaken-Sulawesi Utara. Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi, 2 (2) : 28 – 35.
- Casertano, M., M. Mena dan C. Imperatore. 2020. The Ascidian-Derived Metabolites with Antimicrobial Properties. Antibiotics, 9, 510: 1 – 30.
- Chen. L., J. Hu, J. Xu, C. Shao dan G. Wang. 2018. Biological and Chemical Diversity of Ascidian-Associated Microorganism. Marine Drugs, 16, 362: 1 – 33.
- Davis, W. W dan T. R. Stout. 1971. Disc plate methods of microbiological antibiotic

- assay. *Microbiology*, 22 : 659 - 665.
- Hastuty, A, R. Mairani dan K. K. Rosada. 2020. Antibacterial and Anti-Biofilm Activities of Culture Filtrates from *Schizophyllum commune*, *Coniothyrium* sp. and *Fusarium* sp. *Makara Journal of Science*, 24 (2) : 86 -94.
- Hudzicki, J. 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology*, hal 1 - 23.
- Joel, E. L dan B. V. Bhimba. 2013. A Secondary Metabolite with Antibacterial Activity Produce by Mangrove Foliar Fungus *Schizophyllum commune*. *International Journal of Chemical, Environmental and Biological Science*, 1(1) : 165 - 168.
- Kjer. J, A. Debbab, A. H. Aly dan P. Proksch. 2010. Methods for Isolation of Marine-derived Endophytic Fungi and Their Bioactive Secondary Products. *Nature Protocols*, 5 (3): 479 – 490.
- Opa, S. L, R. A. Bara, G. S. Gerung, R. M. Rompas, R. A. J. Lintang dan D. A. Sumilat. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 1 (1) :69 - 80.
- Pastra, D. A, Melki dan H. Surbakti. 2012. Penapisan Bakteri yang Bersimbion dengan Spons Jenis *Aplysina* sp sebagai Penghasil Antibakteri dari Perairan Pulau Tegal Lampung. *Maspari Journal*, 4 (1): 77 - 82.
- Colin, P. L dan C. Arneson. 1995. *Tropical Pacific Invertebrates: A Field Guide to the Marine Invertebrates Occuring on Tropical Pacific Coral Reefs, Seagrass Beds and Mangroves*. Beverly Hills: Coral Reef Press.
- Shenkar, N dan B. J. Swalla. 2011. Global Diversity of Ascidiacea. *PLoS ONE*, 6 (6) : 1 – 12.
- Sumilat, D. A, D. S. Wewengkang, C. P. Paruntu, N. D. C. Rumampuk dan H. Rotinsulu. 2014. Cytotoxic Activity of Ascidian *Eudistoma* sp. from Mantehage Island. *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*, 1 (1) : 1 - 6.
- Sumilat, D. A, H. Yamazaki, K. Endo, H. Rotinsulu, D. S. Wewengkang, K. Ukai dan M. Namikoshi. 2017. A new biphenyl ether derivative produced by Indonesian ascidian-derived *Penicillium albobiverticillium*. *J Nat Med*, 71 : 776 - 779.
- Sumilat, D. A, D. S. Wewengkang, H. Rotinsulu, H. Yamazaki, T. Oda, K. Ukai dan M. Namikoshi. 2018. Bioactivity of extracts from ascidians collected in North Sulawesi as seeds of marine-derived drugs. *AAFL Bioflux*, 11 (2) : 516 - 524.
- Sumilat, D. A, J. R. T. S. L. Rimper, E. T. Opa dan D. Kurnia. 2019. The potential of marine ascidians as source of natural antioksidan and antibacterial agents from Manado, North Sulawesi. *AAFL Bioflux*, 12 (1) : 373 - 377.
- Tatsuta, T, M. Hosono, H. Rotinsulu, D. S. Wewengkang, D. A. Sumilat, M. Namikoshi dan H. Yamazaki. 2017. Lissoclibadin 1, a Polysulfur Aromatic Alakloid from the Indonesian Ascidian *Lissoclinum* cf. *badium*, Induces Caspase-Dependent Apoptosis in Human Colon Cancer Cells and

- Suppresses Tumor Growth in Nude Mice. *Journal of Natural Products*, 80 : 499 - 502.
- Watters, D. J. 2018. Ascidian Toxins with Potential for Drug Development. *Marine Drugs*, 16, 162 : 1 - 33.
- World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. World Health Organization, p. 257.
- Wewengkang, D. S, D. A. Sumilat dan H. Rotinsulu. 2014. Sitotoksitas Ekstrak Kasar Ascidian dari Pulau Bunaken. *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*, 1 (1) : 86 - 89.
- Yamazaki, H, W. Nakayama, O. Takahashi, R. Kirikoshi, Y. Izumikawa, K. Iwasaki, K. Toraiwa, K. Ukai, H. Rotinsulu, D. S. Wewengkang, D. A. Sumilat, R. E. P. Mangindaan dan M. Namikoshi. 2015. Verruculides A and B, two new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from an Indonesia ascidian-derived *Penicillium verruculosum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25 : 3087 - 3090.