

## ISOLASI DAN UJI ANTIBAKTERI DARI ISOLAT BAKTERI YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS *Callyspongia aerizusa* SERTA IDENTIFIKASI SECARA BIOKIMIA

Angelika Gratia Liemepas<sup>1)</sup>, Widya Astuty Lolo<sup>1)</sup>, Paulina Yamlean<sup>1)</sup>

1)Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado

### ABSTRACT

*Sponge Callyspongia aerizusa contain potential bioactive compound that can be utilized in the health sector. Extract of sea sponge Callyspongia aerizusa, can hamper the growth of Salmonella typhi bacteria, Streptococcus pyogenes, Shigella and Staphylococcus epidermidis. The aim of this study was to test the antibacterial activity against Escherichia coli and Staphylococcus aureus bacteria and identify the type of symbiotic bacteria of Callyspongia aerizusa sponge based on their physiological and biochemical characteristics. The method of testing the antibacterial activity was agar diffusion method (Kirby and Baurer diffusion disc). There were three bacterial isolates namely T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, and T<sub>3</sub> isolates. The result showed that T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, and T<sub>3</sub> bacterial isolates had antibacterial activity against Escherichia coli and Staphylococcus aureus test bacteria. Based on the biochemical test, T<sub>2</sub> bacterial isolates were identified as Bronchothrix bacteria and T<sub>1</sub> and T<sub>3</sub> bacterial identified as Desulfotomaculum.*

**Keywords:** *Callyspongia aerizusa, Antibacterial activity, symbiont bacteria, Biochemical Identification*

### ABSTRAK

Spons *Callyspongia aerizusa* memiliki kandungan senyawa bioaktif potensial yang dapat dimanfaatkan dibidang kesehatan. Ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella* dan *Staphylococcus epidermidis*. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri dari bakteri simbiosis spons *Callyspongia aerizusa* terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dan mengidentifikasi jenis bakteri simbiosis spons *Callyspongia aerizusa* berdasarkan karakteristik fisiologis dan biokimianya. Metode pengujian aktivitas antibakteri yang digunakan yaitu metode difusi agar (*disc diffusion Kirby and Baurer*). Terdapat tiga isolat bakteri yaitu isolat T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, dan T<sub>3</sub>. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, dan T<sub>3</sub> memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Berdasarkan uji biokimia, isolat bakteri T<sub>2</sub> diduga sebagai bakteri *Brochothrix* dan isolat bakteri T<sub>1</sub> dan T<sub>3</sub> diduga sebagai bakteri *Desulfotomaculum*.

**Kata kunci:** *Callyspongia aerizusa, Aktivitas antibakteri, Bakteri simbiosis, Identifikasi Biokimia*

## PENDAHULUAN

Spons merupakan salah satu komponen biota penyusun terumbu karang yang mempunyai potensi bioaktif yang belum banyak dimanfaatkan. Hewan laut ini mengandung senyawa aktif yang presentase keaktifannya lebih besar dibandingkan dengan senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan darat (Muniarsih dan Rachmaniar, 1999).

Komunitas mikroba yang beragam dan berjumlah besar pada spons diduga merupakan sumber dari berbagai senyawa bioaktif tersebut. Isolasi bakteri yang bersimbiosis dengan spons, dan karakterisasi senyawa bioaktif yang dihasilkan bakteri tersebut merupakan strategi yang dapat digunakan dalam memproduksi berbagai senyawa yang memiliki potensi terapi antibakteri dalam jumlah besar (Proksch *et al.*, 2003).

Pengambilan senyawa bioaktif secara langsung dari tanamannya akan membutuhkan banyak biomassa atau bagian dari tanaman tersebut, maka untuk mengefisienkan cara memperoleh senyawa bioaktif tersebut, digunakan mikroba simbiosis spesifik yang diperoleh dari bagian dalam tanaman yang diharapkan mampu menghasilkan sejumlah senyawa bioaktif yang dibutuhkan tanpa harus mengekstrak dari tanamannya (Tan dan Zou, 2001).

Penelitian yang dilakukan oleh Manggalea (2015) menyatakan jamur endosimbiosis yang diisolasi dari spons laut *Callyspongia sp.* memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*.

Bakteri simbiosis yang banyak terdapat pada tumbuhan dilakukan untuk menambah atau memperkaya koleksi mikroba. Selanjutnya mikroba tersebut perlu diidentifikasi untuk mengetahui sifat pertumbuhan dan jenisnya, sehingga lebih lanjut dapat dimanfaatkan di bidang kesehatan (Noverita *et al.*, 2009).

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri bakteri simbiosis yang diisolasi dari spons terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dan mengidentifikasi jenis bakteri simbiosis yang memiliki daya antibakteri berdasarkan karakteristik fisiologis dan biokimianya.

## METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2018 - Maret 2019 di Laboratorium Taksonomi Jurusan Biologi dan Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Sam Ratulangi.

### Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu masker, sarung tangan, gunting, zipper bag, wadah, pisau, erlenmeyer (*Iwaki ST Pyrex*), timbangan digital (*ADAM*), gelas ukur (*Iwaki ST Pyrex*), gelas kimia (*Iwaki ST Pyrex*), cawan petri (*Iwaki ST Pyrex*), autoklaf (ALP), pinset, lumpang dan alu, pembakar spiritus, pipet tetes, batang pengaduk, laminar air flow (*Biotek*), rak tabung reaksi, tabung reaksi, lemari pendingin, incubator, rotary shaker incubator (*Infors HT*), cakram (*paper disc*), mikropipet (*Ecopipette*), jarum ose,

jas lab, *aluminium foil*, *l-glass*, plastik *wrap*, ketas label, spidol permanen, tissue, kapas, jangka sorong, mikroskop cahaya, kaca objek.

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu spons *Callyspongia aerizusa*, bakteri uji *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, aquadest, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), Kristal violet, safranin, lugol, alcohol, minyak imersi, larutan *covac*, *simmon's sitrat agar* (SCA), *triple sugar iron agar* (TSIA), *lysine iron agar* (LIA), *hydrogen peroksida*, NaCl 0,9%, tablet antibiotik *tetrasiklin*.

### Isolasi Bakteri Simbion

Penanaman bakteri yang bersimbiosis dengan spons dilakukan dengan metode sebaran menurut Madigan (2012). Sebanyak 1 g sampel spons *Callyspongia aerizusa* dicuci, dihancurkan kemudian digerus menggunakan lumpang dan alu sampai halus. Selanjutnya, 1 g sampel yang telah halus dimasukkan ke dalam 9 mL NaCl sehingga diperoleh pengenceran sampel sebesar  $10^0$ . Pengenceran bertingkat selanjutnya dilakukan untuk seri  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  dan  $10^{-3}$ . Masing-masing seri kemudian diambil 100  $\mu$ L dan disebar ke dalam cawan petri steril yang berisi media NA dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37-39°C selama 1x24 jam. Koloni bakteri simbion yang tumbuh diamati warna, bentuk, elevasi, tepian dan ukurannya. Koloni- koloni bakteri dipisahkan dengan jarum ose berdasarkan perbedaan karakteristik makroskopik dan mikroskopiknya pada media NA baru dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu 37-

39°C selama 24 jam. Isolat yang telah murni kemudian dipindahkan dan disimpan pada media NA miring untuk dijadikan stok. Seluruh rangkaian penelitian dilakukan secara aseptik dengan dalam *laminar air flow* (LAF) untuk mencegah kontaminasi dari mikroorganisme lain.

### Pengujian Aktivitas Antibakteri

Bakteri simbion disiapkan dengan cara satu ose isolat bakteri simbion diinokulasikan ke dalam 10 mL media cair NB dan diinkubasi selama 24 jam dalam rotary shaker dengan suhu 37-39°C. Masing-masing koloni bakteri simbion dalam media cair NB kemudian dipindahkan ke dalam tabung sentrifuge dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian diambil.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode difusi agar (*disc diffusion Kirby and Bauer*) dengan menggunakan aquades sebagai kontrol negatif dan antibiotik tetrasiklin sebagai kontrol positif yang dapat menghambat sintesis protein bakteri uji. Pada pengujian aktivitas antibakteri ini, cakram (*paper disc*) yang digunakan berukuran 6 mm dengan daya serap 50  $\mu$ L tiap cakram. Sampel yang telah ditentukan konsentrasinya ditotolkan pada masing-masing cakram dengan menggunakan mikropipet.

Ambil sebanyak 100  $\mu$ L *staphylococcus aureus* dan *echericia coli*, dipipet dan diletakkan pada media NA yang telah mengeras. Masing-masing cawan petri diberi label dan nomor sampel yang sesuai. Letakkan kertas cakram yang telah ditotolkan sampel spons diletakkan dengan

pinset kedalam cawan petri lalu diinkubasi selama 24 jam

### Identifikasi Bakteri Secara Morfologi, Fisiologi dan Biokimia

Uji morfologi dilakukan dengan pewarnaan Gram, sedangkan uji fisiologi dilakukan dengan uji motilitas. Identifikasi bakteri secara biokimia dilakukan dengan uji H<sub>2</sub>S, uji fermentasi karbohidrat, uji sitrat, uji lisin, uji indol dan uji katalase.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Determinasi Sampel

Determinasi sampel spons *Callyspongia aerizusa* bertujuan untuk mengetahui bahwa sampel yang diambil tepat dan mengidentifikasi bagian demi bagian dari sampel. Determinasi sampel merupakan proses dalam menentukan nama / jenis sampel secara spesifik. Determinasi dilakukan di Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi. Hasil dari

identifikasi sampel menunjukkan bahwa jenis spons yang hendak diteliti adalah spons *Callyspongia aerizusa*.

### Uji Aktivitas Antibakteri Spons

Hasil uji daya antibakteri yang diperoleh menunjukkan bahwa diameter zona hambat yang terbentuk dari ketiga isolat bakteri simbiosis spons *Callyspongia aerizusa* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dikategorikan sedang. Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri simbiosis spons *Callyspongia aerizusa* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif.

Penelitian mengenai daya hambat dari ekstrak spons laut *Callyspongia sp.* sudah pernah dilakukan sebelumnya pada penelitian Korompis (2017) namun terhadap bakteri uji yang berbeda. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak spons laut *Callyspongia sp.* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella* dan bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

**Tabel 1. Hasil pengukuran rata-rata diameter daya antibakteri dari isolat T1, T2, T3 terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Escherichia coli***

	Rata-rata Diameter (mm)				
	T1	T2	T3	K. positif	K. negatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,00	8,00	9,00	14,00	0
<i>Escherichia coli</i>	9,00	8,60	9,00	18,00	0

### Identifikasi Biokimia Isolat Bakteri

Uji biokimia bakteri merupakan suatu cara atau perlakuan yang dilakukan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi

melalui sifat-sifat fisiologinya. Hasil identifikasi biokimia dapat dilihat dalam tabel 3.

**Tabel 2. Hasil identifikasi biokimia masing-masing isolat bakteri simbion spons *Callyspongia aerizusa*.**

Isolat	Gram	Bentuk	Katalase	Sitrat	Lisin	Fermentasi karbohidrat	H <sub>2</sub> S	Indol	Motilitas
T1	+	Basil	-	-	+	-	+	-	-
T2	+	Basil	+	+	-	+	-	-	-
T3	+	Basil	-	-	-	-	+	-	-

Pewarnaan Gram bertujuan untuk memperjelas sel bakteri dengan menempelkan zat warna ke permukaan sel bakteri sehingga ditentukan pengelompokan bakteri berdasarkan perbedaan komponen dinding sel. Bakteri gram positif adalah bakteri yang mempertahankan zat warna metal ungu sewaktu proses pewarnaan gram. Bakteri jenis ini akan berwarna biru atau ungu di bawah mikroskop sedangkan bakteri gram negatif akan berwarna merah atau merah muda. Perbedaan klasifikasi antara kedua jenis bakteri ini terutama berdasarkan pada perbedaan struktur dinding sel bakteri. Bakteri gram negatif adalah bakteri yang tidak mempertahankan zat metal ungu pada metode pewarnaan gram, sementara bakteri gram-positif akan mempertahankan warna ungu setelah dicuci dengan alkohol.

Uji H<sub>2</sub>S dilakukan untuk mengamati kemampuan bakteri dalam mengubah asam amino alanine dan H<sub>2</sub>S dengan menggunakan media *Triple Sugar Iron Agar*. Isolat bakteri dengan hasil positif

yaitu dengan adanya warna hitam atau kehitaman pada media berarti bakteri

tersebut mampu memfermentasi asam amino. Sedangkan jika hasil negatif berarti bakteri tidak mampu melakukan fermentasi asam amino.

Uji indol digunakan untuk mengetahui apakah kuman mempunyai enzim triptophanase sehingga kuman tersebut mampu mengoksidasi asam amino tryptophan membentuk indol. Hasil positif dapat dilihat dari terbentuknya lapisan berwarna merah pada saat penambahan reagen Kovac's yang artinya bakteri mampu membentuk indol. Pada uji ini semua hasil yang diperoleh negatif yang berarti ketiga isolat bakteri tidak memiliki enzim triptophanase sehingga tidak mampu mengoksidasi asam amino tryptophan (Hemraj, 2013).

Uji motilitas bertujuan untuk mengetahui gerak kuman dengan menggunakan media *Nutrient Agar*. Hasil negatif apabila terlihat adanya penyebaran yang berwarna putih hanya pada bagian

tusukan inokulasi sedangkan hasil positif apabila terlihat adanya penyebaran yang berwarna putih seperti akar disekitar inokulasi. Pada uji memperlihatkan hasil negatif pada semua isolat yang berarti bahwa ketiga isolat bakteri ini tidak memiliki flagel (Burrows, 2004). Menurut Waluyo (2009), flagella merupakan salah satu struktur utama di luar sel bakteri yang menyebabkan terjadinya pergerakan (motilitas) pada sel bakteri.

Uji fermentasi karbohidrat bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menghidrolisis karbohidrat. Pada uji ini isolat T2 menunjukkan hasil yang positif yaitu terjadi perubahan warna menjadi kuning tanpa adanya pembentukan gas yang berarti isolat bakteri T2 memiliki kemampuan dalam menghidrolisis karbohidrat tanpa disertai pembentukan gas.

Pada uji lisin, isolat bakteri T1 menunjukkan hasil yang positif. Hasil positif apabila terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning dan kembali menjadi ungu. Hal ini menunjukkan isolat bakteri memiliki kemampuan dalam memecah lisin yang ada pada media.

Uji katalase berguna dalam mengidentifikasi kelompok bakteri yang dapat menghasilkan enzim katalase. Hasil positif apabila terdapat gelembung – gelembung gas setelah ditambahkan

hydrogen peroksida. Isolat bakteri T2 menunjukkan hasil yang positif. Hal ini berarti isolat bakteri T2 memiliki enzim katalase yang dapat memecah  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$ . Menurut Lubis *et al.* (2014), Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena menginaktivasi enzim dalam sel. Katalase merupakan enzim yang digunakan mikroorganisme untuk menguraikan hidrogen peroksida menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$ .

Uji sitrat bertujuan untuk mengetahui apakah kuman menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Jika bakteri mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya maka akan menaikkan pH dan mengubah warna medium biakan dari hijau menjadi biru (Sunarjo, 1994). Hasil positif apabila terjadi perubahan warna media dari hijau menjadi biru. Sedangkan hasil negative apabila tidak terjadi perubahan warna media dari hijau menjadi biru. Isolat bakteri T2 menunjukkan hasil yang positif terhadap uji ini yang berarti isolat bakteri T2 menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon (Ratna, 2012).

Hasil uji  $H_2S$ , uji indol, uji motilitas, uji karbohidrat, uji lisin, uji katalase, dan uji sitrat isolat bakteri, disesuaikan dengan buku Bergey's microbiology, maka hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3. Hasil identifikasi isolat bakteri berdasarkan identifikasi biokimia**

Kode Isolat	Hasil Identifikasi Bakteri
T1	Desulfotomaculum
T2	Brochothrix
T3	Desulfotomaculum

Desulfotomaculum merupakan bakteri pereduksi sulfat yang bermanfaat untuk bioremediasi. Bioremediasi bertujuan untuk memecah atau mendegradasi zat pencemar menjadi bahan yang kurang beracun atau tidak beracun (karbon dioksida dan air) atau dengan kata lain mengontrol, mereduksi atau bahkan mereduksi bahan pencemar dari lingkungan.

Brochothrix sering dijumpai pada daging yang merupakan bakteri pembusuk, bakteri ini sangat penting karena menyebabkan pembusukan secara luas pada daging dan produknya dengan cara memproduksi bau busuk yang membuat daging tidak enak (Sneath *et al*, 1986).

#### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, isolat bakteri simbiosis spons *Callyspongia aerizusa* memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan golongan daya antibakteri dikategorikan sedang dan isolat bakteri simbiosis spons *Callyspongia aerizusa* diduga sebagai bakteri *Desulfotomaculum* dan bakteri *Brochothrix* yang diuji secara biokimia.

#### SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yaitu identifikasi isolat bakteri secara molekuler sehingga didapatkan hasil identifikasi bakteri yang lebih akurat dan selanjutnya dapat dimanfaatkan.

#### DAFTAR PUSTAKA

Burrows, W., J.M. Moulder, R.M. Lewert. 2004. *Textbook of Microbiology*.

W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Hemraj, V., 2013. A review on Commonly Used Biochemical Test For Bacteria. India: Departement of Pharmacy, L R Intitute of Pharmacy, Solan (H.P).

Korompis., Christi, M., Edward, N. 2017. Uji Daya Hambat Ekstrak Spons Laut *Callyspongia aerizusa* terhadap Pertumbuhan Bakteri *Shigella* dan *Staphylococcus epidermidis*. *Jurnal eBm*. 5(2)

Lubis, L, A, M. 2002. *Lele ikan berkumis paling populer*. Agromedia. Jakarta.

Madigan, M., Stahl, C. 2012. *Biology of Microorganisms*. Pearson Education, San Francisco.

Manggalea F.P., J. Posangi., M.P. Wowor., Bara R. 2015. Uji Efek Antibakteri Jamur Endosimbiosis Spons Laut terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*. *ebm*. 3(1): 377.

Muniarsih T., Rachmaniar R. 1999. Isolasi Substansi Bioaktif Antimikroba Dari Spons Asal Pulau Pari Kepulauan Seribu. Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia; Jakarta.

Noverita, D., Fitria.. E. Sinaga. 2009. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit dari Daun dan Rimpang *Zingiber ottensii*. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 4(4): 171-176.

- Proksch, P., R. Ebel., R.A., Edrada., P., Schuup., W.H. Lin., Sudarsono. V. Wray., K. Steube. 2003. Detection of Pharmacologically Active Natural Products using Ecology selected Example from Indopacific. Marine Invertebrates and Sponge-derived Fungi. *Pure and Appl Chem.* 75(3)
- Ratna, S. 2012. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur dasar Laboratorium.* Gramedia, Jakarta
- Sneath P.H.A., Jones D. 1986. Genus *Brochothrix*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2, pp. 1249-1253.
- Sunarjo, 1994. *Penyehatan Air dalam Program Penyediaan dan Pengolahan Air Bersih.* Direktorat Jenderal PPM & PLP, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Tan, R. X., Zou, W. X. 2001. Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites. *Natural Product Reports.* 18(4): 448-459.
- Waluyo, L. 2009. *Teknik dan Metode Dasar Mikrobiologi.* UMM Press, Malang.