

SKRINING AKTIVITAS ANTIBIOTIK JAMUR SIMBION PADA SPONS DI PERAIRAN MALALAYANG

(*Antibiotic Activity Screening of Symbiotic Fungi Derived from Marine Sponges
Growing in Malalayang Waters*)

Frengky Sihombing^{1*}, Robert A. Bara¹, Losung Fitje¹

1. Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Manado.

*e-mail: frengkiiharry@gmail.com

In this research we used several marine sponges growing in Malalayang Waters as a source of symbiotic. Isolation methods of the fungi were followed the methods described priory Bara *et al.* 2013. The Antibiotic test method was using the modified Kirby-Bauer method. Fungus showed statically antibiotic activity when they were cultivated on rice medium for 10 days incubation. Induction of *Staphylococcus aureus* carried on the fungal isolate that shows strongest Antibiotic activity. The purpose of these inductions into the fungal culture is to trigger the studied fungus to produce a specific compound through its silent biosynthetic pathway. The incubation process was terminated by maceration by adding 80% methanol into the culture,. Continued by partitioned methods by using ethyl acetate, n-hexane, methanol and water solvents to obtain n-hexane, methanol and water fractions. Each fraction was tested their antibiotic activity by using the method described above. Eleven fungal isolate derived from four marine sponges isolated in this study. Three isolates show strong antimicrobial activity towards clinical isolate *Staphylococcus aureus*. The 1.1 and 1.2 fungal isolates derived from sponge *P. melobesioide* while the 2.1 isolate derived from *Plakotis* sp. These fungal isolates were cultivated on rice media followed by extraction and partition procedures. The Antibiotic activity test of each fraction of the fungal isolates showed only on methanol fraction that shows Antibiotic activity, concluded the active *antibiotic* compound that are semipolar. However the induction of *S. aureus* did not influence the studied fungi to produce more *antibiotic* compound.

Keywords: Sponge, Symbiotic Fungi, Antimicrobial activity test, Malalayang Waters

Penelitian tentang antibiotik dari jamur simbion pada spons di Perairan Malalayang telah dilakukan. Metode isolasi jamur berdasarkan Bara *et al* 2013. Pengujian antibakteri menggunakan metode Kirby-Bauer yang dimodifikasi. Jamur yang memperlihatkan aktivitas antibiotik yang kuat dikultivasi statis dan di induksikan bakteri *S.aureus* dalam media nasi. Pemberian bakteri pada kultur jamur bermaksud untuk memicu adanya aktivitas antibiotik yang lebih kuat melalui jalur biosintesis senyap (Silence Biosynthetic Pathway). Isolat jamur di maserasi dengan metanol 80 %. Ekstrak dipartisi dengan beberapa pelarut (etil asetat, n-heksan, metanol dan air) untuk memperoleh fraksi n-heksan, metanol dan air. Tiap fraksi diuji kembali aktivitas antibiotiknya. Diperoleh 11 isolat jamur dari spons laut, tiga isolat jamur yaitu isolat jamur 1.1, 1.2 dan 2.1 menunjukkan aktivitas antibiotik terkuat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Fraksi metanol menunjukkan aktivitas antibiotik yang kuat dan melebihi antibiotik yang digunakan. Hal ini berarti senyawa yang dikandung fraksi metanol bersifat semipolar. Induksi bakteri tidak memberikan pengaruh terhadap aktivitas antibiotik.

Kata Kunci: Spons, Jamur Simbion, Antibiotik, Perairan Malalayang.

PENDAHULUAN

Wilayah laut Indonesia yang sangat luas, menjadikan Perairan ini memiliki potensi kekayaan alam yang besar dengan tingkat keragaman hayati yang tinggi. Pemanfaatan organisme laut tidak hanya terbatas sebagai bahan makanan dan kecantikan sebagai sumber bahan kimia alam yang berpotensi sebagai bahan obat (Achiruddin *et al*, 2005).

Resistensi bakteri terhadap antibiotik bukan merupakan sesuatu yang baru (Levy and Marshal, 2004). Penggunaan antibiotik yang berlebihan merupakan penyebab utama dari besarnya jumlah bakteri patogen dan komensal yang resisten terhadap antibiotik. Peningkatan resistensi bakteri terhadap antibiotik merupakan ancaman serius terhadap bidang kesehatan, karena itu diperlukan penemuan dan pengembangan jenis antibiotik baru yang dapat melawan mekanisme resistensi. Kebutuhan antibiotik baru masih sangat diperlukan, terutama yang efektif melawan bakteri resisten.

Resistensi mikroorganisme terhadap obat-obat yang beredar menyebabkan banyak peneliti yang berusaha mencari bahan-bahan antibiotik baru.. Informasi mengenai kandungan antibiotik dari jamur simbiosis spons masih kurang sehingga penelitian tentang mikroorganisme yang bersimbiosis dengan spons dari perairan Sulawesi Utara, khususnya perairan Malalayang perlu dilakukan.

Spons laut memiliki potensi bioaktif yang sangat besar (Bara, 2007). Kemampuan spons dalam menghasilkan senyawa bioaktif karena adanya hubungan simbiotik dengan mikro organisme. Jamur dan bakteri yang bersimbiosis dengan spons memiliki potensi yang besar dan diduga kuat berperan menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang selama ini diisolasi dari spons (Lee *et al*, 2001).

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel

Sampel spons diambil di Pantai Malalayang pada kedalaman 0,5-5 meter dengan menggunakan peralatan snorkling. Sampel spons yang didapat dimasukkan ke dalam kantong sampel dan diberi label lalu dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasitika Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Manado. Sampel spons diidentifikasi dengan cara mengamati morfologinya (warna, bentuk dan tekstur). Hasil pengamatan berpedoman pada Van Soest (1989), Colin dan Arneson (1995) dan "www.sponsguide.com".

Alat-alat dan media yang digunakan dalam bersih dan steril Media yang digunakan adalah media Malt Ekstrak Agar (MEA), Media Kombinasi yang digunakan sebagai media pengujian aktivitas antibiotik dari jamur endosimbion terhadap bakteri uji, Media Nasi, dan Media Nutrien Agar (NA).

Isolasi Jamur.

Masing-masing sampel spons dibersihkan dan dipotong kecil-kecil berbentuk dadu. Selanjutnya potongan spons diletakkan pada media malt ekstrak agar (MEA) pada cawan petri. Lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 3x24 jam untuk menumbuhkan isolat jamur. Jamur yang tumbuh pada potongan spons diamati berdasarkan ciri-ciri morfologinya dan diisolasi kembali pada media Malt Ekstrak Agar (MEA) steril. Setelah itu diinkubasi selama 7 hari sehingga diperoleh biomassa yang cukup untuk uji awal aktivitas antibiotik.

Skrining Aktivitas Antibiotik dari Jamur Endosimbion

Jamur endosimbion yang sudah tumbuh diambil sebagian dari miseliumnya menggunakan kawat ose steril dan

dipindahkan ke media kombinasi yang sudah diolesi bakteri uji (*S. aureus* dan *E. coli*). . Selanjutnya, diinkubasi pada suhu ruang selama 1-2x24 jam. Pengamatan aktivitas antibiotik dari masing-masing isolat jamur terhadap bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli* dilakukan setelah masa inkubasi berakhir.

Kultivasi dan Ekstraksi Jamur Pada Media Nasi

Jamur-jamur simbiosis yang memiliki aktivitas antibiotik terbaik dikultivasi pada media nasi dalam labu erlenmeyer dan selanjutnya diinkubasi selama 10 hari pada suhu ruang. Media nasi yang sudah ditumbuhkan jamur isolat ditambahkan bakteri *S. aureus* untuk menguji pengaruhnya terhadap aktivitas antibiotik. Ekstraksi dilakukan setelah miselia jamur endosimbiosis sudah mencapai bagian dasar dari labu erlenmeyer. Ekstraksi dilakukan dengan merendam masing-masing jamur dengan metanol selama 3x24 jam. Selanjutnya ekstrak difiltrasi dan diuapkan menggunakan rotary vacuum evaporator pada suhu 40°C.

Pengujian Antibiotik Dari Ekstrak Jamur

Pengujian antibiotik dilakukan dengan metode Kirby-Bauer dan teknik difusi agar menggunakan kertas cakram (Fall, 2011). Bakteri *S. aureus* dan *E. coli* dikultur dalam larutan salin (0,9% NaCl). Suspensi bakteri uji yang telah bertumbuh diambil dan dimasukkan ke dalam nutrisi agar yang agak panas kemudian dikocok merata dengan kepadatan bakteri 10^5 . Setelah itu dituangkan ke cawan petri lalu dibiarkan hingga memadat. Selanjutnya diletakkan kertas cakram steril dan di atas kertas cakram ditetesi 20µL ekstrak jamur simbiosis dengan konsentrasi 10.000 ppm. Selanjutnya bakteri diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter zona

hambat yang terbentuk di sekeliling kertas cakram.

Partisi

Ekstrak kasar jamur yang memiliki aktivitas antibiotik terkuat dipartisi dengan berbagai pelarut untuk mendapatkan fraksi-fraksi (etil asetat heksan, metanol dan air). Untuk mengeluarkan pelarut yang digunakan, masing-masing fraksi larut di evaporasi menggunakan vacuum rotary evaporator pada suhu 40°C

Uji Aktivitas Antibiotik

Pengujiannya menggunakan difusi agar dengan cara sumur. Media yang digunakan terdiri dari lapisan dasar dan lapisan pembersihan. Nutrien Agar dituang ke dalam petri sebagai lapisan dasar, selanjutnya setelah media dingin/memadat di atasnya dituang media NA yang mengandung 10^5 bakteri uji, lalu dibiarkan mengeras. Selanjutnya dibuat beberapa sumur, dan kedalam sumur-sumur dimasukkan ekstrak uji (fraksi metanol, fraksi heksan dan fraksi air) konsentrasi 10.0000 ppm sebanyak 50µL. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur diameternya. Antibiotik kloramfenikol digunakan sebagai pembanding (kontrol positif)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Spons

Identifikasi morfologi didasarkan pada panduan yang digunakan, diperoleh empat jenis spons yaitu: *Placospongia melobesoides*, *Plakortis* sp., *Agelas mauritiana*, dan *Acervo chalina confuse* (Gambar 1).

Jamur Simbiosis pada Spons

Isolasi jamur dari empat jenis spons di diperoleh 11 jenis isolat jamur



Placospongia melobesioides

Plakortis sp.



Agelas mauritiana

Acervochalina confuse

Gambar 1. Jenis-jenis sampel spons

dengan karakteristik umum miselia berwarna hitam, bening, putih, dan coklat.

Pada spons *P. melobesioides* diisolasi 3 jamur simbiosis dengan warna putih dan hitam. Spons *Plakortis sp.* terdapat 3 jenis jamur simbiosis dengan warna putih kekuningan dan hitam, spons *A. confuse* diisolasi 2 jenis jamur simbiosis dengan warna putih bening dan putih sedangkan pada spons *A. mauritiana* diisolasi 3 jamur simbiosis dengan warna putih (Tabel 1). Miselia jamur simbiosis yang sudah tumbuh pada media malt ekstrak agar diinkubasi selama 10 hari.

Aktivitas Antibiotik dari Isolat Jamur

Pengujian aktivitas antibiotik dari 11 isolat jamur simbiosis memperlihatkan bahwa tiga isolat jamur mampu memberikan aktivitas antibiotik terhadap bakteri *S. aureus* yaitu isolat 1.1, 1.2, dan 2.1 yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekitar kertas cakram. Ke-11 isolat tidak menunjukkan aktivitas antibiotik terhadap bakteri *E. coli*. Isolat jamur yang telah diisolasi dari spons memiliki spektrum yang sempit yang hanya mampu bekerja pada bakteri Gram positif (Olson, 1993). Tabel 2 menunjukkan ukuran diameter jamur simbiosis.

Data yang ditampilkan pada Tabel 3 menunjukkan bahwa ketiga isolat jamur yang bersimbiosis dengan spons memiliki diameter zona hambat yang berbeda. Isolat jamur yang memiliki zona hambat (diameter) paling besar yaitu jamur 1.1 dan jamur 2.1. Kedua isolat jamur tersebut ditumbuhkan kembali pada media nasi dan diinkubasi selama 10 hari untuk mendapatkan ekstrak jamur cukup untuk diuji aktivitasnya.

Pada tabel 3 dapat dilihat bahwa berat setiap ekstrak berbeda-beda. Pemberian bakteri terhadap jamur simbiosis tidak memberikan pengaruh terhadap kandungan senyawa serta berat biomassa jamur. Dari keempat ekstrak, isolat jamur 2.1 lebih banyak dibanding ekstrak isolat jamur lainnya.

Pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa berat ekstrak jamur simbiosis kultur tunggal dengan kultur yang diinduksi bakteri tidak memperlihatkan adanya perbedaan. Induksi bakteri terhadap jamur simbiosis tidak memberikan pengaruh yang berarti terhadap biomassa jamur.

Aktivitas Antibiotik dari Ekstrak Isolat Jamur Simbiosis

Diameter zona hambat dari keempat ekstrak jamur simbiosis terhadap bakteri *S. aureus* (Gambar 2)

Tabel 1. Ciri-ciri isolat jamur yang diisolasi dari 4 Jenis Spons

No	Jenis Spons	Jumlah Jamur	Warna miselia isolat	Bentuk jamur
1.	<i>Placosponsgia melobesioides</i>	3	(S 1.1) Putih (S1.2) Hitam (S1.3) Putih	Berserabut Berserabut Berserabut
2.	<i>Plakortis</i> sp.	3	Putih (S 2.1) Putih (S 2.2) Hitam(S 2.3)	Berserabut Berserabut Berserabut
3.	<i>Agelas mauritiana</i>	2	Bening (S 3.1) Putih (S 3.2)	Berserbuk Berserbuk
4.	<i>Acervochalina confuse</i>	3	Putih (S 4.1) Putih (S 4.2) Putih (S 4.3)	Berserabut Berserabut Berserabut

Tabel 2. Aktivitas antibiotic isolat jamur terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*

No	Jenis Jamur	Bakteri	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli.</i>
1	Jamur 1.1	12.0 mm	0
2	Jamur 1.2	8.5mm	0
3	Jamur 1.3	0	0
4	Jamur 2.1	17.5 mm	0
5	Jamur 2.2	0	0
6	Jamur 2.3	0	0
7	Jamur 3.1	0	0
8	Jamur 3.2	0	0
9	Jamur 4.1	0	0
10	Jamur 4.2	0	0
11	Jamur 4.3	0	0

pengukuran zona hambat dapat dilihat pada Tabel 4.

Gambar 2 menunjukkan bahwa aktivitas antibiotik dari ekstrak isolat jamur simbion 2.1 memiliki aktivitas antibiotik terhadap *S. aureus*. Penelitian Tagman *et al* (2015) tentang aktivitas antibakteri ekstrak kasar dari jenis spons yang sama yang dikoleksi dari Perairan Mauritius mengungkap spons tersebut memiliki aktivitas terhadap bakteri *S. aureus*.

Kemungkinan senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh spons tersebut juga dihasilkan oleh jamur yang bersimbiosis dengan simbiionnya. Hal ini didukung oleh Proksch (2002) yang menyatakan produk alami dari invertebrata laut termasuk spons yang menunjukkan senyawa hampir sama dengan senyawa yang dihasilkan oleh mikroba (bakteri, mikroalga dan jamur) setidaknya terlibat dalam proses biosintesis senyawa-senyawa ini atau



Gambar 2. Aktivitas Antibiotik Ekstrak Jamur Symbion terhadap Bakteri *S. aureus*.

merupakan sumber sebenarnya dari senyawa-senyawa ini. Induksi bakteri *S.aureus* dilakukan pada kedua isolat jamur symbion 1.1 dan 2.1 dengan tujuan untuk memicu jamur menghasilkan senyawa tertentu dengan sifat antibakteri melalui jalur biosintesis senyap. Namun, aktivitas serta zona hambat yang dihasilkan oleh isolat 1.1 yang dikultivasi bersama bakteri ini tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan kultur jamur yang sama tanpa pemberian bakteri. Penambahan bakteri pada kultur jamur tidak meningkatkan aktivitas antibakteri maupun biomassa ekstrak yang dihasilkan.

Tiga fraksi yaitu fraksi metanol, heksan dan air dengan berat yang hampir sama. Hasil pemisahan fraksi dapat dilihat pada gambar 3 dan Tabel 5 menunjukkan berat dari ketiga fraksi.

Pengujian aktivitas terhadap ketiga fraksi memperlihatkan, hanya fraksi metanol yang memberikan aktivitas antibiotik terhadap bakteri *S. aureus* Aktivitas antibiotik atau diameter zona hambat yang dimiliki oleh fraksi metanol termasuk yang sangat baik.

Tabel 3. Berat ekstrak isolat jamur symbion pada media nasi

No	Jenis Isolat Jamur	Berat (mg)
1	Jamur 1.1	90
2	Jamur+Bakteri 1.1	90
3	Jamur 2.1	690
4	Jamur+Bakteri 2.1	650

Tabel 4. Aktivitas antibiotik jamur symbion terhadap bakteri *S.aure*

Jenis Jamur	Diameter Rata-rata
Jamur 1.1	25,3±1,5
Jamur 2.1	23,0±2,0
Jamur + Bakteri 1.1	23,3±1,5
Jamur + Bakteri 2.1	21,6±1,1

Tabel 5. Berat fraksi isolat jamur symbion 1.1

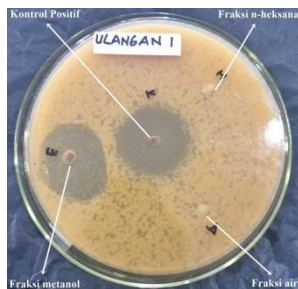
No	Jenis larutan	Berat(Mg)
1	Metanol	60
2	n-heksan	50
3	Air	61

Tabel 6. Diameter zona hambat fraksi metanol, heksan, air dan antibiotik terhadap bakteri *S.aureus*.

No	Fraksi	Rata-rata
1	Metanol	46
2	Heksan	-
3	Air	-
4	Kontrol Positif	45



Gambar 3. Partisi fraksi n-heksana dan metanol.



Gambar 4. Aktivitas antibiotik isolat jamur 1.1 fraksi metanol, air dan n-heksana dari spons *P. melobesioides*

Karena tidak berbeda jauh dengan antibiotik pembanding yang digunakan seperti yang ditunjukkan pada Tabel 6

Senyawa aktif antibiotik dari jamur ada pada fraksi metanol, hal ini menandakan bahwa senyawa antibiotik yang terkandung pada isolat jamur yang diteliti dalam penelitian ini merupakan senyawa sifat semi polar.

KESIMPULAN

Diperoleh 11 isolat jamur dari spons *P. melobesioides*, *Plakortis* sp., *A. confusa* dan spons spesies *A.mauritiana*. Aktivitas antibiotik dari isolat jamur hanya mempengaruhi bakteri *S. aureus* yang merupakan gram positif, isolat tersebut adalah isolate dengan kode 1.1 dari spons *P. melobesioides* dan 2.1 dari spons *Plakortis* sp. Induksi bakteri *S. aureus* pada media nasi yang digabungkan dengan isolat jamur symbion tidak memberikan pengaruh terhadap aktivitas antibakteri jamur tersebut dan fraksi metanol mampu menghambat aktivitas bakteri *S. aureus*. Hal ini menandakan bahwa senyawa antibiotik dari isolat jamur 1.1 adalah senyawa dengan sifat semi polar.

DAFTAR PUSTAKA

- Achiruddin, I. 2005. Pemantauan Perubahan Garis Pantai di Pantai Timur Surabaya dengan Teknologi Penginderaan Jauh, *Jurnal Geoid*. 1(1):.81-86.
- Bara, R. 2007. *Study metabolic rate and metabolism in the spons Haliclona oculata using different ¹³C labeled substrates*. Thesis. Wageningen University. The Netherlands. p 47
- Colin P.L., Arneson, C. 1995. Tropical Pacific Invertebrates. Coral Reef Press. California.
- Lee, Y.K., Lee, J.H., Lee, H.K. 2001. Microbial symbiosis in Marine Sponss. Pdf.
- Levy, S.B., Marshall, B. 2004, Antibiotic Resistance Worldwide: Causes, Challenges and Responses, *Nature Medicine Supplement*, vol.10 no.12

- Proksch, P., Edrada, R.A., Ebel, R.
2002. Drugs from the seas –
current status and
microbiological implications 4
February 2002 / Revised: 12
March 2002 / Accepted: 13
March 2002 / Published online:
12 June 2002 Springer-Verlag
2002 *Appl Microbiol Biotechnol.*
59:125–134
- Tangman, S., Joyce, S.G., Marie, D.
2015, *Bioactive Profile of
Plakortis Nigra, a Sea Sponge
From Mauritius Islands.*,
Dapartement of agriculture and
food science, Faculty of
Agriculture, University of
Mauritius, Reduit, Mauritius.
- Van Soest, R.W.M. 1989, The
Indonesian Spons Fauna: A
Status Report, *Neth. J. Sea
Res*, 23: 223–230.