

## ISOLASI BAKTERI YANG BERSIMBION DENGAN ASCIDIAN *Herdmania momus* YANG MEMILIKI AKTIVITAS ANTIBAKTERI

(Isolation of Ascidian *Herdmania momus* Symbiotic Bacteria with Antibacterial Activity)

Silvia E. Koyongian<sup>1\*</sup>, Deiske A. Sumilat<sup>1</sup>, Rosita A. J. Lintang<sup>1</sup>, Stenly Wullur<sup>1</sup>,  
Sandra O. Tilaar<sup>1</sup>, Henneke Pangkey<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Ilmu Kelautan, FPIK UNSRAT Manado

<sup>2</sup>Jurusan Manajemen Sumber Daya Perairan, FPIK UNSRAT Manado

\*email: koyongiandsilvia9@gmail.com

### Abstract

Ascidian are marine invertebrates in coral reef ecosystems that produces many bioactive compounds for pharmacology. The presence of symbiotic bacteria with marine organisms is protect the host biota by producing secondary metabolites. The purpose of this study is to obtain symbiotic bacterial isolates with *Herdmania momus* ascidian, then to observe the antibacterial activity of these bacterial isolates against *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. Isolation and culture of the symbiotic bacteria were made on *Nutrient Agar* and *Zobell Marine Broth* media. The antibacterial screening showed that the *Herdmania momus* symbiotic bacteria were able to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

**Keywords:** ascidians, *Herdmania momus*, bacteria, isolation, antibacterial

Ascidian adalah avetebrata laut di ekosistem terumbu karang yang banyak menghasilkan senyawa bioaktif untuk bidang farmakologi. Keberadaan bakteri yang bersimbion dengan organisme laut pada umumnya untuk melindungi biota yang ditumpanginya dan dirinya dengan cara menghasilkan senyawa metabolit sekunder. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendapatkan isolat bakteri yang bersimbion dengan ascidian *Herdmania momus*, kemudian mengamati aktivitas antibakteri dari isolat bakteri tersebut terhadap *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*. Isolasi dan kultur bakteri yang bersimbion dengan ascidian dibuat pada media *Nutrient Agar* dan *Zobell Marine Broth*. Skrining aktivitas antibakteri menunjukkan isolat bakteri yang bersimbion dengan ascidian *Herdmania momus* mampu menghambat pertumbuhan organisme uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

**Kata kunci:** ascidian, *Herdmania momus*, bakteri, isolasi, antibakteri

### PENDAHULUAN

Ascidian merupakan avertebrata di ekosistem terumbu karang yang banyak menghasilkan senyawa bioaktif untuk bidang farmakologi. Dimana hewan ini dapat berasosiasi dengan mikroba fotosintetik dan mempunyai potensi molekular yang besar, karena kandungan metabolit sekundernya yang merupakan substansi bioaktif (Karim *et al.*, 2018) Senyawa bioaktif yang disintesis oleh ascidian merupakan metabolit sekunder, yaitu metabolit turunan secara biosintetik dari metabolit primer yang digunakan dalam sistem pertahanan diri, yaitu untuk mempertahankan hidup dan menghindari gangguan dari organisme lain di lingkungan tempat hidupnya. Karena aktivitas farmakologinya maka senyawa tersebut memiliki prospek untuk diisolasi dan dimanfaatkan dalam bidang farmasi (Sumilat *et al.*, 2018).

Penelitian terhadap ascidian telah berkembang dengan baik, yang mengarah pada isolasi berbagai metabolit yang memiliki struktur yang unik dan senyawa bioaktivitas yang besar. Hal ini membuat ascidian memiliki potensi sebagai sumber obat-obatan baru untuk mengobati berbagai penyakit; produk yang dihasilkan seperti larvasida (Rumengan, 2010; Mangindaan dan Taroreh, 2013) antitumor, antikanker (Tatsuta *et al.*, 2017; Sumilat *et al.*, 2017; Watters, 2018) antibakteri (Liu *et al.*, 2004; Opa dkk., 2018; Sumilat *et al.*, 2019), antioksidan (Sumilat *et al.*, 2019) dan antijamur (Karim *et al.*, 2018).

Ascidian *Herdmania momus* merupakan ascidian soliter atau hidup menyendiri. Secara morfologi ascidian *H. momus* berbentuk bundar dengan sifon berbentuk terompet. Pinggiran oral sifonnya sangat mencolok, berwarna coklat, berbintik-bintik merah dan putih kebiruan. Beberapa peneliti menempatkan spesies ini kedalam genus *Pyura* (Gosliner *et al.*, 1996). Ascidian *H. momus* diketahui memiliki aktivitas antibakteri dan antioksidan (Sumilat *et al.*, 2019).

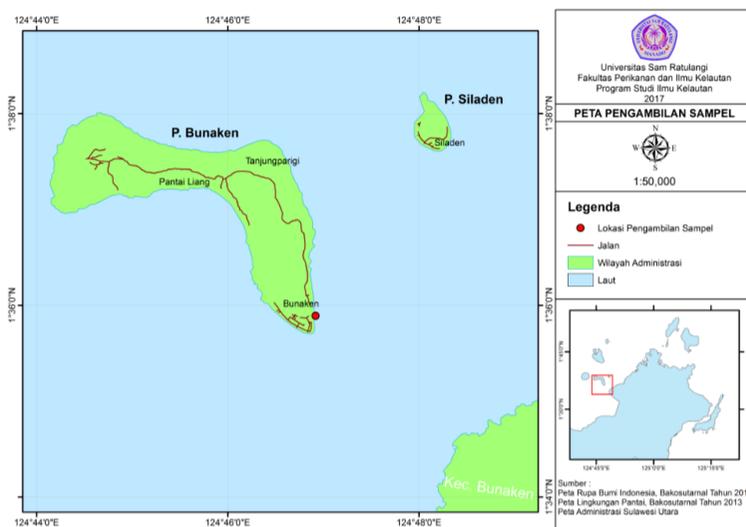
Senyawa bioaktif yang diekstrak secara besar-besaran dari organisme laut akan merusak keberadaan organisme itu sendiri dan bertentangan dengan kepentingan konservasi (Pastra dkk., 2012). Oleh sebab itu, eksplorasi bakteri simbion dari ascidian perlu dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri yang bersimbion dengan ascidian mampu menghasilkan senyawa antibakteri yang dapat bermanfaat dalam bidang farmasi.

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendapatkan isolat bakteri yang bersimbion dengan ascidian *Herdmania momus*, dan melakukan skrining aktivitas antibakteri dari isolat bakteri tersebut terhadap *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*.

## METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini sampel dikoleksi dari Perairan Pangalisang Bunaken, Kecamatan Bunaken, Manado, Sulawesi

Utara. Lokasi pengambilan di daerah intertidal ke subtidal pada celah-celah terumbu karang. Untuk lokasi pengambilan sampel dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Peta lokasi pengambilan sampel.

### Pengambilan dan Identifikasi Sampel

Sampel ascidian diperoleh dari perairan Pangalisang Bunaken dengan cara menyelam (*skin dive*) dengan menggunakan 1 set alat *snorkeling* pada kedalaman  $\pm 3-7$  meter. Pengambilan sampel ascidian dilakukan dengan cara memotong organisme ascidian langsung dari substratnya. Kemudian sampel yang telah dimasukkan ke dalam plastik sampel bersih. Sampel selanjutnya dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasetika Laut Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNSRAT untuk penelitian lebih lanjut.

Identifikasi sampel dilakukan dengan cara mengamati secara morfologi yaitu bentuk, warna, dan tekstur dari ascidian. Identifikasi spesies dipandu menggunakan buku "Coral Reef Animals of the Indo-Pacific" (Gosliner et al., 1996).

### Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini seperti cawan petri, tabung reaksi, pisau, erlenmyer dan pinset dicuci bersih, dikeringkan, dibungkus kemudian disterilkan dalam oven pada suhu  $150^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 2$  jam (sterilisasi kering). Media untuk pertumbuhan mikroorganisme disterilisasi dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit (sterilisasi basah).

### Pembuatan Media NA (*Nutrient agar*)

Pembuatan media NA menggunakan bahan 2 gram NA, 0,5 gram agar, air laut dan akuades. Bahan yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam erlenmyer yang sudah berisi air laut saring 50% sebanyak 100ml. Media dibuat sebanyak 1 erlenmyer dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 15$  menit. Media NA dibuat untuk isolasi bakteri pertama kali.

### Pembuatan Media ZMB (*Zobell Marine Broth*)

Media ZMB dibuat dengan melarutkan 4.025 gram ZMB bersama 2 gram agar dalam wadah erlenmyer berisi 100ml akuades, selanjutnya disterilkan menggunakan otoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 15$  menit.

### Isolasi Bakteri Symbion Ascidian

Proses isolasi, kultur, dan pemurnian bakteri dilakukan berdasarkan panduan buku "*Microbiology Laboratory Manual*" (Varghese and Joy, 2014). Ascidian dipotong kecil-kecil dan dicelupkan selama 60 detik kedalam etanol 70% kemudian ditanam pada media NA dan diinkubasi selama  $2 \times 24$  jam.

### Kultur Bakteri Symbion Ascidian (Pemurnian)

Pemurnian kultur isolat bakteri dimaksudkan untuk mendapatkan koloni terpisah yang merupakan biakan murni. Metode yang digunakan adalah metode gores (*streak plate method*). Metode ini dilakukan dengan menggoreskan 1 ose bakteri pada permukaan media padat ZMB dalam cawan petri dengan pola goresan kuadran.

### Pembuatan Media B1 dan Preparasi Bakteri Uji

*Pembuatan Media B1*: Media B1 dibuat menggunakan bahan Pepton 0,5 gram, ekstrak daging (*meat extract*) 0,3 gram, Natrium Klorida (NaCl) 0,3 gram dilarutkan dalam 100 ml akuades. disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 15$  menit.

Media padat B1 dibuat dengan cara yang sama, hanya menambahkan Agar dengan konsentrasi 2%.

### Preparasi Bakteri Uji

Kultur bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli* dibuat dengan menumbuhkan kedua bakteri tersebut dalam media yang telah dipersiapkan sebelumnya. Sebanyak 1 ose bakteri ditumbuhkan dalam media cair 1x24 jam dan ditambahkan dalam media padat untuk proses pengujian selanjutnya.

### Skrining Antibakteri dari Bakteri Simbion Ascidian

Skrining antibakteri dilakukan terhadap isolat murni yang diperoleh untuk mengetahui isolat mana yang memiliki aktivitas antibakteri. Bakteri uji yang digunakan adalah *S. aureus* dan *E. coli* yang telah dicampurkan ke dalam media B1 padat yang telah disiapkan sebelumnya. Isolat murni ditotolkan pada permukaan media B1 padat yang telah mengandung bakteri uji dan diinkubasi selama 1x24 jam kemudian lakukan pengamatan. Adanya zona hambat (*inhibitory zone/clear zone*) merupakan tanda adanya kepekaan terhadap bakteri uji.

zone) merupakan tanda adanya kepekaan terhadap bakteri uji.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Identifikasi Organisme Ascidian

Sampel ascidian yang diperoleh saat sampling kemudian diidentifikasi dengan mengamati morfologinya dengan dibantu buku "*Coral Reef Animals of the Indo-Pacific*" (1996). Diketahui bahwa ascidian tersebut merupakan spesies *Herdmania momus*. Ciri-ciri ascidian *H. momus* adalah berbentuk globular (bundar), berwarna cokelat, dengan bintik-bintik merah kebiruan. Sifon dari ascidian *H. momus* sangat mencolok keluar (Gosliner *et al.*, 1996) seperti pada Gambar 2. Ciri-ciri tersebut sesuai dengan sampel ascidian yang diperoleh dari perairan Pangalisang, Bunaken.

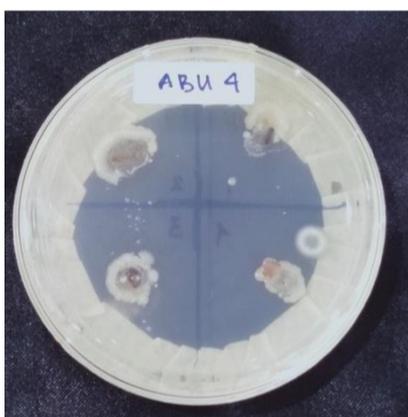


Gambar 2. Sampel ascidian *Herdmania momus*

### Isolasi Bakteri Ascidian

Sampel yang telah diperoleh kemudian dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasetika Laut, FPIK, UNSRAT dan diisolasi. Gambar 3 memperlihatkan adanya

pertumbuhan bakteri pada sekitar potongan sampel ascidian *Herdmania momus* setelah diinkubasi selama 2x24 jam yang ditandai dengan munculnya gumpalan berwarna putih susu.



Gambar 3. Isolasi bakteri ascidian *Herdmania momus*

Bakteri yang tumbuh tersebut kemudian langsung dikultur kuadran untuk mendapatkan koloni tunggal dan diberikan kode pada setiap cawan petri. Hasil kultur

setelah inkubasi selama 1x24 ditampilkan pada Gambar 4 sedangkan jumlah koloni terpisah disajikan dalam Tabel 1



Gambar 4. Kultur bakteri ascidian *Herdmania momus*

Keterangan kode sampel:

- ASB: ascidian bunaken
- ASB 4.4.2: ascidian bunaken 4, strain keempat dan pemurnian kedua
- ASB 4.2.1: ascidian bunaken 4, strain kedua dan pemurnian pertama
- ASB 4.4.1: ascidian bunaken 4, strain keempat dan pemurnian pertama

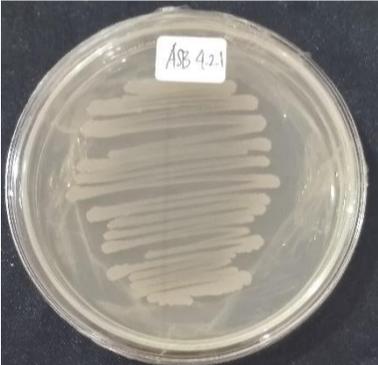
Tabel 1. Jumlah koloni tunggal bakteri simbiosis ascidian *Herdmania momus*

No.	Kode / Isolat	Jumlah Koloni Tunggal
1.	ASB 4.4.2	18
2.	ASB 4.2.1	23
3.	ASB 4.4.1	21

### Pemurnian Bakteri

Hasil pengamatan morfologi isolat murni berdasarkan warna, bentuk dan karakteristik

lain berdasarkan Varghese and Joy, 2014 dapat dilihat pada Gambar 5

No.	Kode Isolat	Karakterisasi
1.	ASB 4.2.1	 <p>Bentuk : Bundar Ketinggian : Menonjol Pinggiran : Bergelombang Warna koloni : Kekuningan Kekeruhan : Tembus cahaya</p>
2.	ASB 4.4.2	 <p>Bentuk : Tidak beraturan Ketinggian : Menonjol Pinggiran : Lobus Warna koloni : Putih susu Kekeruhan : Buram</p>

### 3. ASB 4.4.1



Bentuk : Tidak beraturan  
Ketinggian : Menonjol  
Pinggiran : Lobus  
Warna koloni : Putih susu  
Kekeruhan : Buram

Gambar 5. Karakteristik isolat murni bakteri simbiosis Ascidian *Herdmania momus*

### Skrining Aktivitas Antibakteri dari Bakteri Simbiosis Ascidian

Tabel 3 merupakan hasil skrining aktivitas antibakteri dari isolat murni bakteri simbiosis ascidian *Herdmania momus* terhadap bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli*. Skrining aktivitas antibakteri bertujuan untuk melihat isolat yang berpotensi dalam menghasilkan senyawa-senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Aktivitas antibakteri dilihat dengan adanya zona hambat atau *clear zone/inhibitory zone* pada sekitar isolat yang ditanam pada bakteri uji. Pengamatan hasil skrining aktivitas antibakteri dilakukan 2x24jam untuk mengetahui efek antimikroba yang terjadi pada masing-masing isolat bakteri.

**Tabel 3.** Aktivitas antibakteri dari isolat murni bakteri simbiosis ascidian *Herdmania momus* terhadap bakteri uji

Kode Isolat	Bakteri Uji	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1 / ASB 4.4.2	+	+
2 / ASB 4.2.1	-	-
3 / ASB 4.4.1	+	+

Hasil pengamatan 1x24 pada isolat 1/ASB 4.4.2 dan isolat 3/ASB 4.4.1 memperlihatkan adanya aktivitas penghambatan terhadap bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli*. Sementara pada isolat 2/ASB 4.2.1 tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap bakteri *S. aureus* maupun *E. coli*.

Adanya aktivitas antimikroba pada skrining dapat dihubungkan dengan bakteri yang bersimbiosis dengan ascidian tersebut. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang bersimbiosis dengan ascidian memiliki pertahanan yang baik dalam melindungi diri di lingkungan tempat hidupnya. Sehingga memungkinkan bakteri yang bersimbiosis dengan ascidian *H. momus* menghasilkan senyawa antibakteri. Hal ini diduga bahwa di lingkungan tempat hidupnya ascidian memproduksi senyawa antimikroba dalam bentuk metabolit sekunder untuk melawan semua ancaman yang dihadapinya (Opa, dkk. 2018).

Senyawa antibakteri dapat digolongkan juga sebagai spektrum luas dan spektrum sempit. Spektrum luas artinya senyawa tersebut bekerja aktif terhadap banyak jenis bakteri baik bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Sedangkan spektrum sempit artinya suatu senyawa bekerja aktif hanya terhadap satu golongan bakteri saja baik

hanya pada bakteri gram positif ataupun hanya pada bakteri gram negatif (WHO, 2014). Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa antibakteri ascidian *Herdmania momus* termasuk berspektrum luas dikarenakan kemampuannya menghambat bakteri gram positif dan gram negatif.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Sebanyak total 62 isolat bakteri yang hidup bersimbiosis dengan ascidian *Herdmania momus* berhasil diisolasi, yakni 18 isolat dari ASB 4.4.2, 23 isolat dari ASB 4.2.1 dan 21 isolat dari ASB 4.4.1.
2. Skrining aktivitas antibakteri menunjukkan adanya penghambatan dari isolat bakteri simbiosis ASB 4.2.1, ASB 4.4.1 dan ASB 4.4.2 terhadap bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli*

### DAFTAR PUSTAKA

Gosliner, T. M., Behrens, D. W., Williams, G. C. 1996. Coral Reef Animals of the Indo-Pacific. Monterey, California. Hal: 299.

- Karim, F., Putra, Y.M., Hadi, A. T., Abrar, M. 2018. Antimicrobial and Cytotoxic Properties of the Ascidians *Lissoclinum patella*, *Oxycoryna fascicularis*, *Didemnum molle* and *Botryllus schlosseri*. Original article. *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*. 5 (2): 65-71.
- Mangindaan, R.E.P., dan Taroreh., R.Y. 2013. Pengujian Aktivitas Larvasida dari Ekstrak Ascidian *Lissoclinum pattela* Terhadap Larva Nyamuk *Aedes aegypti*. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. 3(1):13-17.
- Opa, S. L., Bara, R. A., Gerung G. S., Rompas, R. M. Lintang, R. A. J., Sumilat, D. A. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi N-Heksana, Metanol Dan Air Dari Ascidian *Lissoclinum sp.* *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. 1 (1): 69-80.
- Pastra, D. A., Melki dan Surbaktii A. 2012. Penapisan Bakteri yang Bersimbiosis dengan Spons Jenis *Aplysina sp.* Sebagai Penghasil Antibakteri dari Perairan Pulau Tegal Lampung. *Jurnal Maspari* 4 (1): 77-82.
- Rumengan, A.P. 2010. Uji Larvasida Nyamuk (*Aedes aegypti*) dari Ascidian (*Didemnum molle*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 6 (2):83-86.
- Sumilat, D.A., Wewengkang, D.S., Paruntu, C.P., Rotinsulu, H. 2017. Inhibitory Activities of Ascidian *Herdmania momus* on the Colony Formation of Chinese Hamster V79 Cells, collected in Manado North Sulawesi, Indonesia. *Jurnal of Asean Studies and Maritime Issues*. 3 (5):13-19
- Sumilat, D. A., Rimper J. R. T. S. L., Opa T. E., Kurnia D. 2019. The Potential of Marine Ascidians as Sources of Natural Antioxidant and Antibacterial agents from Manado, North Sulawesi. *AAFL Bioflux* 12 (1): 373-377.
- Tatsuta T., Hosono M., Rotinsulu H., Wewengkang D.S.S., Sumilat D. A., Namikoshi M., Yamazaki H. 2017. Lissoclibadin 1, a polysulfur aromatic alkaloid 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 (2): 499-502.
- Varghese, N., Joy, P. P. 2014. *Microbiology Laboratory Manual*. Pineapple Research Station. Kerala Agricultural University. Hal. 1-77.
- Watters D. J., 2018 Ascidian toxin with potential for drug development. *Marine Drugs* 16 (5): 162.
- WHO. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. World Health Organization. Hal. 257.